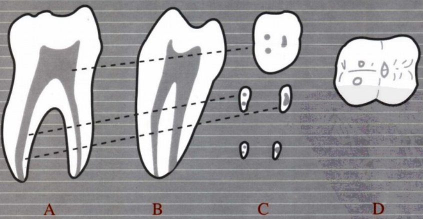
牙髓生物学

Endodontic Biology

主　编　史俊南　　主编助理　王英



世界图书出版公司

VISIT…

LANZAROTE Caliente.com

微信公众号

口 腔 视 频

微信搜索qzkqsp1即可关注

福利1

关注后可观看正畸、修复、种植等精彩内容

福利2

关注后领取口腔解剖病理学视频讲座全集

福利3

加入视频分享交流群，解答疑难病例，获取更多视频资源

扫二维码，关注公众号
领取更多口腔资料

● 策　　划／邵小婷
任卫军
● 责任编辑／邵小婷
● 视觉设计／飞洋美术

·世图口腔内科学系列丛书·

● 临床儿童口腔科学
● 临床口腔内科新进展
● 实用口腔解剖学图谱
● 口腔科急症诊断与治疗
● 实用牙髓病诊疗学
● 牙髓生物学

ISBN 7-5062-6908-2

9 787506 269087 >

ISBN 7-5062-6908-2/R·667
定价：(精) 69.00元

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

牙髓生物学

Endodontic Biology

主　　编　史俊南
主编助理　王　英

世界图书出版公司

西安　北京　广州　上海

图书在版编目(CIP)数据

牙髓生物学/史俊南编著.—西安:世界图书出版西安公司,2005.10

ISBN 7-5062-6908-2

Ⅰ.牙... Ⅱ.史... Ⅲ.①牙髓—生物学②牙髓病—治疗 Ⅳ.R781.305

中国版本图书馆CIP数据核字(2005)第040403号

牙髓生物学

主　　编　史俊南
主编助理　王　英
策　　划　邵小婷　任卫军
责任编辑　邵小婷
视觉设计　飞洋美术

出版发行　世界图书出版西安公司
地　　址　西安市南大街17号
邮　　编　710001
电　　话　029-87214941　87233647(市场营销部)　029-87235105(总编室)
传　　真　029-87279675　87279676
经　　销　各地新华书店
印　　刷　陕西省印刷厂
开　　本　787×1092　1/16
印　　张　18
字　　数　375千字

版　　次　2006年2月第1版　2006年2月第1次印刷
书　　号　ISBN 7-5062-6908-2/R·667
定　　价　69.00元

☆如有印装错误,请与印刷厂联系调换☆

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

《牙髓生物学》编写人员

主　　编　史俊南

主编助理　王　英

编　　者（以姓氏笔画为序）

文玲英　王　英　王成济　王捍国　王景杰　史俊南

朱天龄　吴友农　汪　平　金　岩　张　莹　郝建军

倪龙兴　曹志中

PDG

序

牙髓生物学是20世纪50～60年代逐渐发展而在70年代形成的，随后由于分子生物学的兴起，使牙髓生物学得到了长足的发展。

我国在20世纪中叶虽也有一些有关牙髓生物学方面的研究，但直至80年代才渐具规模，现已达到一定水平。从90年代起，我们已将它作为我们专业的研究生教学课题之一，并在上世纪末编写成教材。近年来经过反复实践、修改、增补而成为我国第一本牙髓生物方面的专著，希望为我国这方面的发展做一点有益工作。热切企盼国内同行的指教和帮助，使其得到改进而趋于完善。

通过50余年教学、临床和科研的认识，我认为牙髓学至少应该包括三部分内容，即牙髓生物学、牙髓病尖周病诊疗学（包括牙髓学与相关学科、病症等的关系）和牙髓治疗学。原来只重视牙髓病学或牙髓治疗学是不够的，不利于这门专业的发展。现在这本《牙髓生物学》就是本人主编之拙著《牙髓学》的第一部分。本书系统地介绍了与牙髓的基础研究相关的解剖学、组织胚胎学、生理学、生物化学、神经生物学、微生物学、免疫学和病理学等方面的内容，以及牙髓生物学研究中常用的实验技术，文献资料丰富翔实，既可作为研究生教材，又可作为从事这方面工作的同志的参考资料。其他部分将于随后逐渐出版。

在编写过程中，得到校、院、科领导和机关多方面的支持和鼓励，参加编写的同志不辞辛苦地撰稿，多次修改，特别要感谢唐荣银教授、赵守亮教授、倪龙兴教授、金岩教授、汪平副教授、张莹副教授、王英博士、王捍国博士、孙汉堂博士、何文喜博士、王胜朝博士以及刘晗、李军维、李娜等同志，为本书的出版加班加点，付出了辛勤劳动。

同时，还要特别感谢世界图书出版公司西安分公司张栓财总经理、任卫军社长和邵小婷编辑的安排和指导，使本书能顺利出版。

由于我们的水平有限，本书的不足甚至错误是在所难免的，希望读者们给予批评、指正。

史俊南

2005年3月1日

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

为什么要研究牙髓生物学

牙髓生物学是在20世纪50年代~60年代逐渐形成的，在此之前，虽然已经有这方面的研究，但未成系统。1970年，美国召开了第一次人牙髓生物学会议，从此牙髓生物学这一名称即已正式确立。1975年，国际牙科研究会成立了牙髓生物学组，并有单独的会员。有关这方面的学术活动，各国经常进行，且已多为专题性质，论文多见于 *Dental Research* 或北欧一些杂志以及其他牙医学杂志或各校学报上。

牙髓生物学的研究在欧洲特别是北欧一些国家较多，且较深入，在美国也很活跃。美国牙科研究会也已成立牙髓生物学组，并与国际牙科研究会牙髓生物学组每月联合出刊《通讯》。有些大学的牙医学院已成立了牙髓生物学实验室，哥伦比亚大学牙医学院还成立了牙髓生理学实验室。

我国在50年代已有一些有关这方面的研究，但直至80年代中期，方有系统的研究报道。

1991年，第四军医大学口腔医学院成立牙髓生物学实验室，从此，我国牙髓生物学步入初具规模的时代。1996年10月，在西安举行了中国第一次国际牙髓生物学会议，日本齿科保存学会积极支持，组团参加。这次学术会议，标志着我国牙髓生物学的研究，已与国际接轨，为今后的发展起到推动作用。

什么叫牙髓生物学

牙髓生物学是研究牙髓和牙髓病、尖周病的基础医学。涉及的内容有：髓腔解剖学、牙髓胚胎学、牙髓组织学、牙髓生物化学、牙髓神经生物学、牙髓微生物学、牙髓免疫学、牙髓生理学、牙髓病理学、牙髓药物学和药理学等。

研究的手段，除过去常用的X线片、组织病理学切片、细菌培养、药物敏感试验、病例分析等外，细胞培养、分子生物学和遗传基因工程技术等也已成为常规方法，从而使研究的内容和结果提高到新的水平，特别在牙髓细胞生物学、牙髓微循环、牙本质－牙髓的神经分布和生理变化、牙髓病尖周病的免疫和炎症介质、牙齿组织工程等方面都已取得长足的发展。

研究牙髓生物学的目的

牙髓是牙体组织中唯一的软组织成分，在牙齿发育中和萌出后担负着形成牙本质及牙齿的营养、防御、感觉等功能。由于牙髓与牙本质有着极为密切的关系，所以常将它们称为牙本质－牙髓复合体。而牙本质构成牙齿的主体，所以牙髓组织健康与否，直接关系着牙齿各部分的形态、结构和功能。

牙胚是牙齿发育的胚胎器官，由成釉器（形成釉质）、牙乳头（形成牙髓和牙本质）和牙囊（形成牙骨质、牙周膜和固有牙槽骨）三部分构成，牙乳头和牙囊均来源于外胚间充质，而牙囊来源于原口凹的外胚层。牙乳头是牙齿发育中重要的细胞凝聚区，它可以确定今后牙齿的形态和大小，直接影响牙胚中其他部分的成熟和功能。牙乳头本身的细胞增殖和分化

决定了牙本质的形态和结构。目前已初步了解在牙乳头中表达的转录因子(如 DLX-1, DLX-2, LEF-1, MSX-1, MSX-2 等)和生长因子(如 FGF 家族成员、TGF-β 和 BMP 家族成员)等因素在调控和介导上皮与外胚间充质的相互作用、凝聚区形成以及细胞的决定和成熟中都发挥着重要的作用。因而,对于发育中牙髓的前身——牙乳头的认识,将有助于加深对牙齿发育的认识。

牙髓的组织形态结构在牙齿萌出前后、乳恒牙替换以及随着人的年龄的变化都发生着变化。由于其所处的特定环境,它的微循环系统、神经供给、淋巴回流以及自我保护等方面与身体其他部位的结缔组织相比具有许多特点,这些都与牙齿的健康、对于外界刺激的反应、自身防御和修复,以及牙髓病的结局等有着密切的联系。对于这些问题的认识直接关系着对牙体牙髓疾病的防治。

在人的一生中,只要牙髓有活力,即不断地形成牙本质,因此年轻人的牙髓腔较大,老年人的牙髓腔即显著缩小。此外,随着牙髓的增龄变化,自身代谢和修复能力也都有所下降。

当牙齿受到外界任何损伤或体内其他因素的影响时,牙髓即有相应的敏感反应,轻者形成修复性牙本质,稍重即可导致炎症,而严重时即致牙髓坏死。

牙齿硬组织如有缺损,其损伤范围小而轻时,牙髓组织有修复、愈合的能力,但因牙髓处于硬组织腔内,其修复愈合能力又受到一定限制,而且目前对其愈合的机制还不清楚。

牙齿发育完成后,其营养代谢主要是通过牙髓,一旦牙髓死亡,牙齿就成为无髓牙,无髓牙虽然仍有新陈代谢,但极低微,因此无髓牙就变脆弱。在患牙髓病时,如何尽可能地保存活髓,这是一个极为重要的研究课题。

牙髓内有丰富的感觉神经,而临床上最常见的牙痛症状,与牙髓就有密切的关系,牙齿对温度、电刺激等都较敏感,但是它是如何传导的,还是一个谜。

目前,从牙髓的形态结构上看是比较清楚了,但从生化学、免疫学、细胞生物学、分子生物学等角度来看,对许多方面只了解一些皮毛,而所有这些方面恰恰是进一步了解牙髓组织的功能和防治牙髓病不可缺少的。

研究牙髓生物学不仅对牙齿的发育有很密切的关系,而且对牙齿的健康及龋病、牙髓病、尖周病的防治有着决定的作用,因此,从根本上说,研究牙髓生物学就是研究牙齿。

(史俊南　郝建军　金岩)

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

目　录

第一章　髓腔解剖学 …… 史俊南　吴友农(1)
第一节　髓腔的形状和体积 …… (1)
第二节　髓室 …… (2)
第三节　根管 …… (4)
第四节　恒牙和乳牙的髓腔应用解剖 …… (13)
第二章　牙髓胚胎学 …… 金　岩(20)
第一节　牙乳头的形成 …… (20)
第二节　牙髓的形成 …… (23)
第三章　牙髓组织学 …… 金　岩　王　英(26)
第一节　牙髓的组织结构 …… (26)
第二节　乳、恒牙牙髓的区别 …… (31)
第三节　乳牙脱落过程中的牙髓变化 …… (31)
第四节　牙髓的增龄变化 …… (32)
第五节　牙髓的基本功能 …… (33)
第六节　牙髓干细胞 …… (35)
第四章　成牙本质细胞分化和牙本质形成 …… 郝建军　王捍国(41)
第一节　成牙本质细胞的表型 …… (41)
第二节　发育中成牙本质细胞的分化 …… (44)
第三节　发育后成牙本质细胞的分化 …… (47)
第四节　二次启动牙本质形成的调控 …… (52)
第五章　牙髓生理学 …… 朱天龄　王景杰(58)
第一节　牙髓微循环生理 …… (58)
第二节　牙髓钙化性修复生理 …… (62)
第六章　牙髓生物化学 …… 王成济　文玲英　王　英(66)
第一节　胶原蛋白 …… (66)
第二节　蛋白多糖 …… (70)
第三节　非胶原糖蛋白 …… (72)
第四节　糖酵解酶系 …… (75)
第七章　牙髓神经生物学 …… 曹志中　文玲英(80)

第一节　牙髓神经的发育和组织学 …………………………………………（80）
第二节　牙髓神经的分类和特征 …………………………………………（81）
第三节　牙髓神经活动的记录 …………………………………………（82）
第四节　牙髓神经对外源性刺激的反应 …………………………………………（83）
第五节　内源性因素对牙髓神经的影响 …………………………………………（85）
第六节　药物对牙髓神经的作用 …………………………………………（86）
第七节　牙髓中的神经肽 …………………………………………（86）
第八节　牙髓的神经生长因子－神经生长因子受体系统 ……………………（93）
第八章　牙髓微生物学 ………………………………………… 倪龙兴（100）
第一节　感染根管内厌氧菌的分离、培养和鉴定 …………………………（100）
第二节　感染根管内的常见菌属 …………………………………………（103）
第三节　感染根管内微生物之间的相互作用 …………………………………（122）
第四节　牙髓微生物的免疫学作用 …………………………………………（124）
第九章　牙髓免疫学 ………………………………………… 文玲英　汪　平（130）
第一节　感染牙髓中的抗原 …………………………………………（130）
第二节　牙髓中的免疫细胞 …………………………………………（135）
第三节　牙髓中的细胞因子 …………………………………………（146）
第四节　牙髓的免疫应答 …………………………………………（175）
第十章　牙髓病理学 ………………………………………… 金　岩（199）
第一节　牙髓组织病理学的研究方法 …………………………………………（199）
第二节　牙髓炎 …………………………………………（203）
第三节　牙髓变性 …………………………………………（206）
第四节　牙髓坏死 …………………………………………（208）
第五节　内吸收 …………………………………………（208）
第六节　尖周病 …………………………………………（209）
第十一章　牙髓药物学 ………………………………………… 张　莹　王　英（212）
第一节　根管内用药 …………………………………………（212）
第二节　牙髓治疗中的全身用药 …………………………………………（217）
第十二章　体外培养技术——牙髓生物学研究的重要手段 … 王捍国　郝建军（221）
第一节　体外培养牙髓、牙周组织的成纤维细胞 ……………………………（221）
第二节　体外培养成牙本质细胞和相关干细胞 ……………………………（223）
第三节　体外培养技术在牙髓细胞分化研究中的应用 ……………………（226）
第四节　体外牙胚培养在成牙本质细胞分化研究中的应用 ………………（229）
第十三章　免疫细胞化学在牙髓免疫学研究中的应用 ……………… 金　岩（239）

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

第一节　牙髓免疫细胞化学技术 …………………………………………… (240)
第二节　原位杂交组织化学 …………………………………………………… (253)
附录
附录一　牙髓微生物学相关细菌菌名索引 …………………………………… (258)
附录二　常见菌群的鉴别 ……………………………………………………… (266)

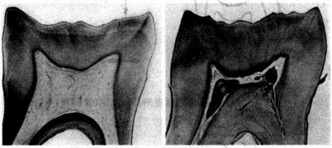
PDG

第一章　髓腔解剖学

牙齿中央的空腔，由牙髓组织充满其中，称为髓腔(pulp cavity)。髓腔在牙冠的部分，称为髓室(pulp chamber)，在牙根的部分，称为根管(root canal)，或称为髓管(pulp canal)。单根牙因无髓室底，髓室与根管之间无明显界限，大致以牙颈部位置为界。

第一节　髓腔的形状和体积

髓腔的形状大致与牙齿的外形相当，但体积比牙齿小。随着年龄的增加，由于继发性牙本质沉积，髓腔的形状和体积也有不同程度的变化(图 1.1)。髓室的高度变化较宽度变化更为显著，根管口也显著缩小。



A　　　　B

A. 8 岁时磨牙的髓室　　B. 55 岁时磨牙的髓室

图 1.1　髓腔的大小随年龄增加而变化(引自 Grossman《Root Canal Therary》)

Stewart(1948)为了研究各类牙的髓腔体积，将各牙开髓后，用 4～6 号扩孔锉扩大根管，冲洗洁净后，灌注汞，由 X 线片检查已充满后，再称汞的重量，计算其体积，结果表明牙髓腔的容积是很小的(表 1.1,1.2)。

表 1.1　上颌牙髓腔的容积(mL)

	中切牙	侧切牙	尖牙	第一前磨牙	第二前磨牙	第一磨牙	第二磨牙
最大	0.02	0.02	0.03	0.04	0.03	0.07	0.05
最小	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	0.03
平均	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.04	0.03

表 1.2　下颌牙髓腔的容积(mL)

	中切牙	尖牙	第一前磨牙	第一磨牙	第二磨牙
最大	0.02	0.02	0.02	0.05	0.05
最小	0.01	0.01	0.01	0.03	0.02
平均	0.01	0.01	0.02	0.04	0.03

注：下颌侧切牙与下颌中切牙大小相似，下颌第二前磨牙与下颌第一前磨牙相似

上表的数字仅供参考，因为各牙未记录年龄，且已扩大根管。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

第二节 髓室

髓室的形状因各类牙外形的不同而不同，后牙的髓室有 6 个壁：在殆方的称为髓室顶(roof of pulp chamber)，在颈方的称为髓室底(floor of pulp chamber)，另外 4 个侧壁各以所在牙的轴面而命名，分别为颊壁、舌壁、近中壁、远中壁。前牙绝大多数为单根，无髓室底，其髓室顶呈线形，后牙髓室顶随着牙殆面的外形而呈弧形面，在牙尖下的称为髓角(horn of pulp chamber)。髓室底通向根管处，称为根管口(orifice of root canal)，也以所在部位而分别命名，例如颊根管口、近中根管口等等。

髓室的形状和大小，随着年龄或牙齿本身所受的各种刺激而有所变化。徐剑青(1988)曾随机收集 25 ~ 30 岁和 60 ~ 65 岁两个年龄组的上、下颌第一磨牙各 30 个，共 120 个牙，分别测量髓室的高度、宽度和牙本质厚度，观察其增龄性变化(图 1.2，1.3；表 1.3，1.4)。

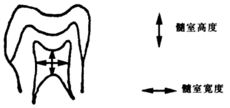


图 1.2 髓室的高度和宽度测量示意图(徐剑青)

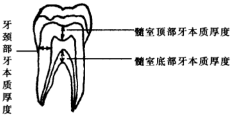


图 1.3 髓室壁牙本质的厚度测量示意图(徐剑青)

表 1.3 第一磨牙髓室的大小和髓室壁的厚度(mm)

牙别	年龄	髓室大小		牙本质厚度		
	(岁)	宽度	高度	髓室顶	髓室底	牙颈部
16，26	25 ~ 30	1.997	2.050	2.841	1.937	2.415
	60 ~ 65	1.723	1.422	3.713	2.509	2.619
36，46	25 ~ 30	3.993	1.569	2.779	2.141	2.400
	60 ~ 65	3.798	0.513	3.625	2.788	2.500

表 1.4　第一磨牙两年龄组髓室大小和髓室壁牙本质厚度的相差值(mm)

牙别	髓室大小		牙本质厚度		
	宽度	高度	髓室顶	髓室底	牙颈部
16,26	0.274	0.628	0.872	0.572	0.204
36,46	0.195	1.056	0.846	0.647	0.100

注:表 1.3,1.4 根据徐剑青原文修改

由于民族不同,牙的形态、长短等略有差异,因而国内外的研究报道结果就不完全相同。髓室也不例外,据邱洪晟等(1991)报道维吾尔族 650 个牙髓室的测量结果,表明其后牙髓室的高度、宽度,前、后牙髓室壁的厚度等都大于汉族人的牙。

张翠贤、郭敬俊、王宇(1994)研究了上、下颌第一磨牙、第二磨牙各 100 个,共 400 个牙的髓室后,将髓室底分为 4 类:

1. 宽平型:髓室宽大,髓室底较平。
2. 窄凹型:髓室窄小,髓室底中央凹陷。
3. 宽凸型:髓室宽大,髓室底凸起。
4. 马蹄型:多见于下颌第二磨牙合并根。

顾永春、皮昕(2001)报道了用立体显微镜直接观察 200 个恒磨牙(上、下颌第一、第二磨牙各 50 个)髓室底的解剖形态,并测量了近中、远中径和颊舌径(表 1.5)。

表 1.5　上、下颌第一、第二恒磨牙髓室底的截面形状和分型(n = 50)

牙别	三角形 牙数(%)	四边形 牙数(%)	五角形 牙数(%)	近中、远中径 ($\bar{x} \pm s$, mm)	颊舌径 ($\bar{x} \pm s$, mm)
16,26	0(0)	50(100)	0(0)	2.35 ± 0.52	4.18 ± 0.54
17,27	30(60)	20(40)	0(0)	1.41 ± 0.59	4.69 ± 0.73
36,46	0(0)	37(74)	13(26)	3.35 ± 0.42	2.82 ± 0.47
37,47	5(10)	45(90)	0(0)	3.35 ± 0.48	2.67 ± 0.62

江茂霞、杜昌连(1994)据 15 ~ 80 岁的 80 个上、下颌切牙 X 线片测量的牙颈部髓室的近中、远中径(表1.6)。

表 1.6　80 个上、下颌切牙牙颈部髓室的近中、远中径(mm)

牙别	牙颈部髓室的近中、远中径($\bar{x} \pm s$)
11,21	1.70 ± 0.54
12,22	1.40 ± 0.47
31,41	0.70 ± 0.22
32,42	0.90 ± 0.32

由于牙冠在口腔中受外界刺激的机会较多,尤其是殆面,因而髓室的形状和大小的改变也较显著,并且髓室顶处继发性牙本质(修复性牙本质)沉积较髓室底处多,所以老年人髓室顶的牙本质厚度远比髓室底的牙本质厚度高,结果使髓室的高度大为降低,有的顶与底极为接近,使髓室剖面呈"H"形,但髓角仍较高,成一线状,称为髓角退缩线。这种患牙在制洞时,在髓角处极易露髓;开髓时,也极易穿通髓室底。治疗时宜注意。

牙齿形态发育异常的,髓室的形状也显异常,例如畸形舌侧窝的舌侧壁,前牙常凹陷呈囊状;后牙殆面畸形中央尖,髓角也较高。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

第三节　根管

根管的形状，大致与牙根的外形相当。例如根为圆锥状，根管也呈圆锥状，自牙颈部或根管口逐渐缩小而至根尖孔；如根为卵圆锥状，则根管横截面即呈卵圆形等等。

根管口大小，随年龄增加而缩小，而且有的卵圆锥状根管，由于继发性牙本质沉积，原来的狭窄处，即合拢而形成两个根管（图 1.4）。根管也随牙根的弯曲而弯曲。

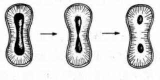


图 1.4　横剖面为卵圆形的根管，年长者因继发性牙本质沉积而成为两个根管

根管常常有许多分支，使根管的解剖形态非常复杂，因而有人称为根管系统，更有所谓大管系统、小管系统等名称。

一、研究根管解剖的方法和结果

研究根管解剖的方法颇多，最早详细描述人牙根管的形状和数目的是 Carabelli（1842），他观察的是牙在不同部位的横切面形态。

Muhlreiter（1891）将 Carabelli 的研究进一步深化，并更清楚和精确地描述根管解剖。

Periswerk（1901）制备根管的金属铸模标本，显示根管的复杂结构和解剖变异。

Fischer（1907）用赛璐珞代替金属制备铸模标本，以证实 Periswerk 所见。

Addoff（1913）用低熔合金灌注后研究髓腔。同年 Fasoli 和 Arlotta 用 Addoff 法观察根管解剖，得出与 Fischer 相同的结果，且有大量标本。

Moral（1914）用印度墨水充填根管显示其结构，然后用改良的 Spalteholz 法制成透明标本。

Hess（1921，1925）鉴于过去许多作者的研究，都未涉及根管形状、数量与年龄和发育的关系，而且也未研究上颌和下颌的切牙、尖牙、前磨牙以及第三磨牙。他将 2 800 个牙开髓后，去髓，填入硬橡皮，经煮沸后固化，然后置酸内溶解牙体组织。根据各牙硬橡皮所成的铸模，进行详细研究，认为年龄与根管解剖很有关系，年轻者特别是约 20 岁前，根管数较年长者少，大多无根尖细支、副管，在根尖孔未封闭前，根管解剖不复杂。Keller（1928）也用同法研究。

Okumura（1927）用透明标本研究了 2 146 个牙，认为透明标本可保持牙根原有的形状，可清楚地显示根管的形状和细微的结构，很少失败，而且标本可长时间保存。

Mueller（1933）对 1 394 个牙进行颊舌向、近中、远中向 X 线片研究其根管解剖，显示了许多前所未知的情况，他认为用磨片、硬橡皮铸模、染色和 X 线片 4 种方法研究，可以得出完整的资料。

Meyer（1958）认为 Hess 和 Keller 用硬橡皮铸模的方法有缺陷，因为根管细支中的内容物不易去净，而且也不易将硬橡皮压入；再者他们只检查 4 mm 长的根尖部，因而他取 6 mm 长的根尖并用连续切片，安装在玻片上，用投射法将每张切片画制下来，然后将每张画按序排列形成根管的模型，从而可显示最小的细微根管的形态和分支情况，得出的结果表明根尖细支数远比 Hess、Keller 所得的多。

卜维亚（1988）对 1 736 个恒牙摄取近中、远中向和唇（颊）舌向两个平面 X 线片，以研究根管解剖，取得 2 309 个牙根解剖资料（表 1.7）。

表 1.7　2 309 个牙根管类型(%)

牙别		牙根数	1－1	2－1	2－2	根尖分支
11,21		105	100.0	0	0	1.0
12,22		148	98.6	1.4	0	3.3
13,23		124	100.0	0	0	7.3
14,24		106	13.2	18.9	67.9	1.9
15,25	颊	119	39.5	5.9	54.6	4.2
	舌	120	53.4	18.9	67.9	1.9
16,26	近中颊	108	61.0	9.0	30.0	0.9
	远中颊	100	91.0	3.0	6.0	0
	舌	112	100.0	0	0	1.8
17,27	颊	102	100.0	0	0	2.0
	舌	102	100.0	0	0	2.9
31,41		120	76.7	20.0	3.3	2.5
32,42		124	72.6	25.0	2.4	3.2
33,43		129	94.5	3.2	2.3	17.1
34,44		123	80.0	0.8	19.2	16.8
35,45		149	96.6	0	3.4	8.1
36,46	近中	103	4.9	15.5	79.6	6.9
	远中	101	53.5	0	46.5	0
37,47	近中	108	50.9	13.9	35.2	0
	远中	106	93.4	0.9	5.7	0.9

注:据卜维亚原表修改

吴友农、岳保利(1995)将年龄 10～80 岁汉族人的恒牙 1 769 个(其中男 739 个,女 1 030 个)制成透明标本研究根管解剖,将根管分为 7 型:

(1) 1－1 型:1 个根管口,1 个根尖孔。

(2) 1－2 型:1 个根管口,2 个根尖孔。

(3) 2－1 型:2 个根管口,1 个根尖孔。

(4) 2－2 型:2 个根管口,2 个根尖孔。

(5) 1－2－1 型:2 个根管有 1 个共同的根管口和 1 个共同的根尖孔。

(6) 2－1－2 型:2 个根管口,2 个根尖孔,根管在中途合二而一。

(7) 其他型:不能分入上述各型者(表 1.8)。

表 1.8　1 769 个恒牙根管类型(%)

牙别	牙根数	1－1	1－2	2－1	2－2	1－2－1	2－1－2	其他
11,21	108	100.00	0	0	0	0	0	0
12,22	110	100.00	0	0	0	0	0	0
13,23	109	100.00	0	0	0	0	0	0
14,24	100	11.00	4.40	26.00	49.00	5.00	5.00	0
15,25	115	37.39	7.83	26.09	24.35	0	4.35	0
16,26	105	23.81	5.71	18.10	43.81	3.81	4.76	0
17,27	105	63.81	6.67	10.48	11.43	2.86	3.81	0.95
18,28	117	12.82	4.27	4.27	7.69	0	0	70.94
31,41	108	86.11	4.63	1.85	0	7.41	0	0
32,42	107	71.03	0	8.41	0.93	18.69	0.93	0
33,43	104	88.46	0	11.54	0	0	0	0
34,44	106	87.74	3.77	1.89	6.60	0	0	0
35,45	105	97.14	2.86	0	0	0	0	0
36,46	145	2.76	5.52	14.48	73.10	0	4.14	0
37,47	104	25.96	3.85	38.46	25.96	0	1.92	3.85
38,48	121	52.07	5.79	4.96	6.61	0	0	30.85

注:上颌磨牙以近中颊根为准,下颌磨牙以近中根为准。据吴友农等原表删改

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

顾永春、皮昕(2003)将拔除的3 803个牙制成透明牙,观察根管形态(表1.9)。

表1.9　3 803个恒牙的根管类型(%)

牙别		牙数	1－1	1－2	1－2－1	2－1	2－2	2－1－2	3	C	其他
11,21		166	100.00	0	0	0	0	0	0	0	0
12,22		102	99.02	0	0	0.98	0	0	0	0	0
13,23		204	99.51	0	0	0.49	0	0	0	0	0
14,24		380	24.74	6.80	0.53	26.58	37.11	3.42	0.26	0	0.53
15,25		259	44.79	1.93	0	28.57	21.24	1.16	1.16	0	1.16
16,26	近中颊	177	33.90	7.91	6.21	28.90	24.96	2.82	2.82	0	0
	远中颊	177	97.18	0.02	0.02	0	0.01	0	0	0	
	腭	177	100.00	0	0	0	0	0	0	0	0
17,27	近中颊	268	65.12	4.27	1.07	12.10	9.61	1.42	1.07	0	
	远中颊	268	98.88	0.37	0	0.37	0	0	0.37	0	0.71
	腭	268	100.00	0	0	0	0	0	0	0	0
	颊	11	1.07	1.07	0.36	0.37	0	0	1.07	0	0
	单管	2	0	0	0	0.36	0	0	0	0	0
18,28	近中颊	206	28.47	8.71	1.41	3.29	3.29	0.94	1.18	0	0.47
	远中颊	206	95.15	0	0.97	2.91	0	0.97	0	0	0
	腭	206	100.00	0	0	0	0	0	0	0	0
	颊	88	11.06	3.10	0.47	4.94	0	0	0.94	0	0.24
	单管	131	16.94	0.94	0.24	5.41	0	0.24	4.71	0	2.35
31,41		177	91.53	0.56	0.56	3.95	0	1.13	1.13	0	1.13
32.42		222	88.29	0.45	0.45	8.56	1.80	0	0	0	0
33,43		221	95.93	0.45	0.45	2.71	0.45	0	0	0	0
34,44		257	82.49	7.78	1.56	2.33	3.11	0	2.33	0	0.45
35,45		227	98.24	0.44	0	0.88	0.44	0	0	0	0
36,46	近中	204	11.27	5.39	0.98	13.24	66.18	0	0.98	0.49	1.47
	远中	204	53.92	4.90	2.94	8.82	23.04	0.49	0.94	0	0
37,47	近中	163	28.57	6.12	4.59	18.88	24.49	0	0.51	0	0
	远中	163	68.37	1.02	1.02	12.24	1.02	0.51	0	0	0
	单管	33	1.02	1.53	0	2.04	0	0	0	12.24	0
38,48	近中	240	57.05	2.95	3.28	8.85	4.92	0.66	0.66	0	0.33
	远中	240	66.65	0.98	0.98	1.64	7.54	0	0.98	0	0
	单管	65	4.92	0	0.33	6.23	0	0	0.66	8.85	0.33

陈永进、张旻、李鸿波等(2002)采用X线片观测677个下颌切牙的根管形态特征、数量、变异情况(表1.10,表1.11)。

表1.10　下颌切牙根管壁的厚度(mm)

牙别	牙数	唇壁	舌壁	近中壁	远中壁
31,41	270	2.26±0.29	2.53±0.35	1.53±0.30	1.53±0.30
32,42	407	2.07±0.25	2.38±0.31	1.48±0.27	1.47±0.23

表1.11　下颌切牙根管类型(%)

牙别	牙数	1－1	1－2	1－2－1	1－2－2	2－1	其他
31,41	270	57.4	3.0	29.6	4.8	1.5	3.7
32,42	407	63.6	4.7	23.1	0	4.4	4.2

注:其他项中,中切牙含网状根管6个,侧切牙含网状根管5个。1－2－2是一个根管口,分为两管,并有两个根尖孔。下同

张清、吴民凯、马惠平(1990)研究了104个下颌侧切牙和100个下颌第一前磨牙在开髓后以扩孔锉探查根管,肉眼和解剖显微镜观察根管和根尖孔(表1.12)。

表 1.12　104 个下颌侧切牙和 100 个下颌第一前磨牙的根管情况(%)

牙别	牙数	1-1	1-2	1-2-1	1-2-2	1-3	2-1	2-1-2	2-2-1	2-2
32,42	104	47.12	6.73	1.92	3.85	0	1.92	0	34.62	3.85
34,44	100	65.00	15.00	0	11.00	4.00	0	2.00	1.00	2.00

注:据原文重行整理

张志良、李萍、吴伟铭等(1990)对门诊患者中 500 个上颌第一前磨牙通过口内 X 线片观察根管情况(表1.13,表1.14)。

表 1.13　500 个上颌第一前磨牙的牙根情况

	直根	弯根	牙根数		合计
			1	2	
牙数	412	88	82	418	500
%	82.4	17.6	16.4	83.6	100

表 1.14　200 个上颌第一前磨牙的根管情况(%)

	1-1	2-1	2-2	1-2-2	合计
牙数	54	28	92	26	200
%	27	14	46	13	100

皮昕、李春芳、李秋华(1995)将 330 个上颌第二前磨牙制成透明标本,用体视摄影显微镜观察根管和根尖孔(表 1.15)。

表 1.15　330 个上颌第二前磨牙的根管情况(%)

	1-1	2-1	1-2-1 或 2-1-1	2-2	合计
牙数	160	62	94	14	330
%	48.48	18.79	28.48	4.25	100

崔恺、汪平、王宇等(2004)对离体的 69 个下颌第一前磨牙、93 个下颌第二前磨牙用近中、远中向 X 线片观察(表 1.16)。

表 1.16　下颌前磨牙的根管情况

牙别	牙数	1-1	1-2	2-2
34,44	69	60(86.96%)	2(2.90%)	7(10.14%)
35,45	93	93(100%)	0	0

王忠桂(1996)在临床上治疗 218 个上颌第一磨牙时,观察到近中颊根管有两管的有 28 个牙(12.84%),这些与年龄不同有关系(表 1.17)。

表 1.17　上颌第一磨牙近中颊根管有两管者与年龄的关系

患者年龄	患牙数	近中颊根管有两管的牙数
13~30	53	9(17.0%)
31~50	88	11(12.5%)
51~76	77	8(10.4%)
合计	218	28(12.8%)

注:根据原文修改

王凯、何权敏、杨杰(1999)观察拔除的 154 个上颌第一、第二磨牙,发现近中颊根管中有两管的为 43 个(27.90%);此外又检查 121 个治疗过的这些牙,其近中颊根管均为单管。

朱蔷、李加志、张文清(2001)对离体的 106 个上颌第一磨牙近中颊根管进行了开髓探

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

查(表 1.18)。

表 1.18 上颌第一磨牙近中颊根管的类型

	1-1	2-1	1-2	2-2	合计
牙数	40	11	1	54	106
%	37.74	10.38	0.94	50.94	100.00

唐道鹤、谢华、周磊等(2002)将上颌第一、第二磨牙各 200 个,上颌第三磨牙 60 个制成透明标本,观察各牙的根管情况(表 1.19)。

表 1.19 上颌磨牙的根管类型(%)

牙别	牙根别	牙根数	1-1	1-2	1-2-1	2-2	其他
16,26	近中颊	200	34.0	6.5	13.0	45.5	1.0
	远中颊	200	96.0	2.5	0.5	1.0	0
	腭	200	99.0	0	1.0	0	0
17,27	近中颊	164	64.0	5.5	6.7	23.2	0.6
	远中颊	164	100.0	0	0	0	0
	腭	164	100.0	0	0	0	0
18.28	近中颊	17	29.4	0	0	70.6	0
	远中颊	17	100.0	0	0	0	0
	腭	17	100.0	0	0	0	0

注:据原文整理

唐道鹤、谢华、周磊等(2002)将下颌第一、第二磨牙各 200 个,第三磨牙 60 个制成透明标本,观察各牙的根管情况(表 1.20),其中第二、第三磨牙分别有 41,38 个牙有融合根,有较多的根管口、根尖孔的根管以及 C 形根管(表 1.21)。

表 1.20 下颌磨牙的根管类型(%)

牙别	牙根别	牙根数	1-1	1-2	1-2-1	2-2	其他
36、46	近中	169	4.10	6.50	27.20	61.00	1.20
(两根)	远中	169	62.70	7.1	23.70	6.50	0
36,46	近中	31	3.23	6.45	29.03	61.30	0
(3 根)	远中颊	31	100.00	0	0	0	0
	远中舌	31	100.00	0	0	0	0
37,47	近中	155	15.50	3.90	69.70	10.30	0.60
(两根)	远中	155	93.50	0.70	2.60	3.20	0
37,47	近中	4	25.00	0	50.00	25.00	0
(3 根)	远中颊	4	100.00	0	0	0	0
	远中舌	4	100.00	0	0	0	0
38,48	近中	22	63.60	9.10	18.20	9.10	0
	远中	22	95.50	4.50	0	0	0

注:据原文整理

表 1.21 下颌磨牙融合根的根管类型(%)

牙别	融合牙根数	根管类型				其他	其中 C 形
		1-1	1-2	1-2-1	2-2		
37,47	41	19.51	7.32	21.45	31.70	19.50	48.80
38,48	38	10.53	5.26	28.95	15.78	39.50	21.20

注:据原文整理

顾永春、皮昕(2002)将152个下颌第二磨牙制成透明标本,观察根管类型(表1.22,1.23)。

表1.22　下颌第二磨牙的根管类型(%)

牙根别		牙根数	1-1	2-1	1-2-2	2-2
单根		10	20.0	40.0	30.0	10.0
双根	近中	85	47.1	27.1	15.3	10.5
	远中	85	92.9	0	2.4	4.7
三根	近中颊	1	100.0	0	0	0
	近中舌	1	100.0	0	0	0
	远中	1	100.0	0	0	0

注:按原文重行整理

表1.23　下颌第二磨牙C形根的根管类型(%)

分型		数目	1-1	2-1	1-2	2-2	C形
近中、远中管颊侧融合	完全性C形	12	0	0	0	0	100.0
	不完全性C形	12	0	0	0	0	100.0
近中、远中管融合		4	0	100.0	0	0	0
近中、远中根颊侧融合,两管仍独立	近中管	28	57.1	14.3	14.3	14.3	0
	远中管	28	78.6	14.3	7.1	0	0

注:按原文重行整理,C形根并非一定含C形根管

二、根尖解剖的研究

Green(1955)认为Hess用硬橡皮铸模的方法研究根管有缺陷:一是硬橡皮注入根管时须加压,有可能造成有些牙根发生裂缝,造成假的侧支根管;二是有些侧支根管不一定通向根面。因而他采用体视显微镜直接观察牙根面,并检查根面显示的孔、管是否通向根管。从而得出的结果,改变了前人研究所得的副管、副孔数。

史俊南、赵皿、蔡绍惠(1964)报道1 400个恒牙的根尖解剖,是用改进的Green法,即用体视显微镜放大20倍,直接观察牙根尖部,并结合年龄、籍贯、民族的关系,除第三磨牙外,观察上、下颌各类牙(左右不分)各100个牙的主孔、副孔的形状,并测量直径以及至根尖、主副孔间的距离。

供牙者年龄10~75岁,上颌右侧316牙,左侧384牙;下颌右侧352牙,左侧348牙。一个牙不一定只有一个主孔,主孔也不一定都在根尖,在根尖的为39.29%~62.00%不等,平均在根尖的为46.41%。主孔不在根尖的百分比随年龄的增加而减少,距根尖为0.06~4.38 mm,平均为0.62 mm。主孔不在根尖的,可在牙根的任何面,但前牙在近中面或唇面的较多,后牙则在远中面的较多。主孔的直径为0.06~1.88 mm,平均为0.39 mm,主孔在20岁以下直径稍大,随着年龄增加而逐渐变小,但在20~50岁之间无明显变动。大多数牙的副孔只有1个,但最多的有12个。其数量与年龄有关系,20岁以下的较少,51岁以上的也较少。绝大多数的副孔不在根尖,平均直径为0.21 mm,约为主孔直径的一半。

主孔为卵圆形的占45.70%;其次为圆形,占41.78%;其余为扁形(5.66%)、不规则形(6.86%)。副孔的形状圆形的占58.87%,其次为卵圆形(35.85%)、扁形(2.92%)、不规则形(2.36%)。

所研究的牙都是在西安市收集的,其中西北籍的671牙,华东籍的214牙,华北籍的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

248 牙，其余为华中籍（82 牙）、华南籍（35 牙）、东北籍（69 牙）、西南籍（81 牙），以西北、华东、华北三地区进行比较，牙有无副孔无差别。

王晓仪、周来生、梁景平等（1985）报道 240 个恒前牙（上、下颌中切牙、侧切牙、尖牙各 40 个）的根尖孔位置和根尖部牙本质牙骨质界至根尖的距离，结果表明根尖孔在根尖的 17.5%～45.0%，平均为 30.8%，其余可在根尖部的各个侧面；各类牙根尖部牙本质牙骨界质距根尖孔为 0.41～0.63 mm，平均为 0.54 mm。另收集恒前牙 120 个，分为 15～30 岁、55 岁以上两组，各 60 牙，测得根尖孔在根尖的分别为 33.3%、32.3%；根尖孔不在根尖时，距根尖分别平均为 0.296 mm、0.399 mm，牙本质牙骨质界距根尖孔分别平均为0.378 mm、0.602 mm，表明年龄增大时，根尖牙骨质沉积较多。因而作者指出：根管充填在 X 线片显示已达根尖，实际已超出牙本质牙骨质界；根管充填时，在年轻者应距根尖 0.7 mm，在年老者应距根尖 1 mm。

宗兰君、丁毅、虞宁娜等（1989）对 50 个恒牙的根尖孔用扫描电镜观察，表明主孔呈圆、卵圆、哑铃、肾、逗号形，副孔则数目不等，少则 1 个，多则 30 个以上，可惜未注别牙位和年龄（图 1.5～1.10）。

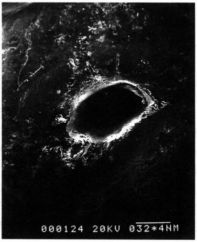


图 1.5　上颌中切牙（年龄 20～30 岁）
根尖孔扫描电镜像　×46

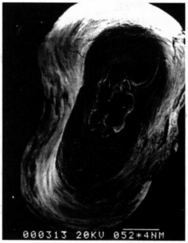


图 1.6　下颌中切牙（年龄 20～30 岁）
根尖孔扫描电镜像　×30

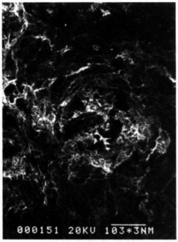


图 1.7　上颌尖牙(年龄 50～60 岁)
根尖孔扫描电镜像　×140
显示牙骨质增生使根尖孔成数个小孔



图 1.8　上颌第一前磨牙(年龄 50～60 岁)
根尖孔扫描电镜像　×20
左侧有一副孔



图 1.9　上颌第一磨牙近中颊根(年龄 30～40 岁)
根尖孔扫描电镜像　×40

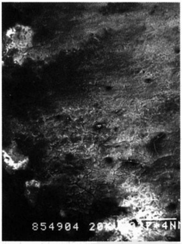


图 1.10　下颌磨牙(年龄 40～50 岁)
根尖部扫描电镜像　×55
显示有多个副孔

皮昕、陈中、李春芳(1990)报告对 1 088 个 20～30 岁的牙根尖孔位置进行了观测，提出了主孔位于根尖的有 56.53%，副孔位于根尖的极少，为 6.52%，位于旁侧的有 93.46%，结果与史俊南等报道的有差异。我们推测其原因可能是收集的牙未记录年龄，是按吴汝康等的方法估计的，这是考古的方法，对近代人似乎并不精确，而年龄与根尖孔关系很密切。

卢华芳、顾乐平、何慧燕等(1995)观测 15～78 岁的 2 125 个牙根尖，共 3 341 个牙根、3 399个根管、3 399个根尖孔，主孔不在根尖的占 20%，其形状有圆形、卵圆形或其他形。副

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

孔有 1 301 个，其中位于根尖的为 21%，位于根尖侧的为 79%，距离根尖的平均距离为 681 ± 473μm。

陈中(1988)用体视显微镜观测 162 个上颌前牙的根尖，年龄估计为 18～30 岁，主孔在根尖的为69.14%，平均大小为 0.42mm，绝大多数呈圆形和椭圆形，扁形和不规则的较少。有副孔的牙仅 8 个，共 16 个副孔，平均大小为 0.22mm，距根尖的平均距离为 1.19mm，绝大多数为圆形和椭圆形，扁形的较少。

李雨琴、陈霄迟、胡建英等(1992)观察拔除的恒前牙 1 447 个，其中主孔在根尖的为 71.3%，不在根尖的距离平均为 0.77～1.20mm。

以上各资料由于研究方法不同、种族不同、年龄不同、牙数不同而结果不一致，因此无可比性，只能作参考。我们认为：

1.牙齿的增龄变化较为显著，特别是研究根管、根尖部必须记录年龄，例如根管的大小、数目、根尖孔在不在根尖以及主、副孔的大小，与根尖的距离等，各随年龄增大，并且根尖部牙骨质沉积，使根尖孔离开根尖而偏向一侧。现在我国还缺乏各年龄组的详细资料。

2. 研究的方法不同，指标不同，结果就可能不一致，例如透明标本有很多优点，但直接观察牙根面的方法似更符合需要。因此研究的方法最好由几种方法联合运用，可以相互补偿不足，从而可得到较全面的结果。

3. 研究牙齿，必须有一定的数量，现在的资料，牙齿数量不一，在这方面就无可比性。究竟要多少牙数，现在尚无定论。这本身也是一个研究课题。一般说，变数较多的，数量就要大些。

4. 人类牙齿外形、结构、数目，不论种族，都是一样的，但牙齿长度、大小，髓腔壁厚度，根管数目等等，仍有这样或那样的差别。国外所报道的一些资料，与我国的就有不同，现在我们从实用出发，所列举的都是国内资料。

三、根管系统各部分的命名

在根管研究的过程中，有些作者根据研究情况，对根管系统各部分进行了各种命名：主根管、主髓管；副根管、副髓管；侧支根管、旁侧根管、根管侧支、管间侧支、管间吻合、管间交通支、横管、水平管；根尖细支、根尖分叉、根尖三角洲；副管、侧副根管；有的则将主根管及其主要分支称为大管系统，其他则称为小管系统等等。名称极不统一，有的是一个部位有多种名称，有的是一个名称泛指多个部位，有的则使用组合名称。

刘乃好、张悟颖(1985)针对这一混乱现象，提出了根管的命名原则。

将根管的髓室端作为起点，牙周膜端为止点或将根管近根尖端为止点，命名为：

1. 起于髓室底，止于根尖部的牙周膜，称为主根管。

2. 起于髓室底，止于根尖部以外的牙周膜，称为副根管。

3. 起于根管，止于牙周膜，称为侧支根管。

4. 起于根管，止于根管，称为交通根管。如起止点为同一根管，称为管内交通根管；如起止于不同根管，则称为管间交通根管。

5. 髓室底处起点如有两个开口，而以一个开口于根尖部牙周膜者，称为融合主根管。

6. 根管口：髓室与根管连接处或根管与根管连接处，称为根管口，例如副根管口、侧支根管口；交通根管的根管口，可视其距髓室的远近，分别称为近端根管口、远端根管口。

7. 孔:根管在牙周膜处的开口称为孔,主根管的末端仍称为根尖孔,其余以同名根管加孔字表示,例如副根管孔、侧支根管孔等。

这是我国学者首次提出的根管系统的命名原则。

皮昕、李春芳、顾永春(1996)认为根管系统各部的名称是当今解剖学中名称最多又最不统一的内容之一,根据 4 000 余个恒牙髓腔形态的研究资料,在尊重传统根管系统各部名称的前提下,提出了统一名称的命名原则和命名。

1. 命名原则:

(1)命名应以准确、实用、便于理解为前提。

(2)根据起止、部位、形态来命名,有利于理解和记忆。

(3)一个名称仅指一种形态,以免名称混乱。

2. 根管系统各部的命名:

(1)根管(按起止和部位命名):凡起自髓室底,穿过牙根,开口于根尖的管道均称为根管,不以开口于根尖部或距根尖 3mm 作为划分根管和副根管的界限,将有利于根管的分型。

(2)副根管(按起止和部位命名):凡起自髓室底,穿过根柱,开口于根分叉表面的管道。

(3)根管侧支(按起止和形态命名):凡起于根管,开口于牙根表面的管道。

(4)根尖分歧(按部位和形态命名):根管在根尖处的细小分支,根管仍存在。

(5)根尖分叉(按部位和形态命名):根管在根尖分为两个以上的分支,根管不复存在。

(6)管间吻合(按部位和形态命名):起自相邻根管呈水平、弧形或网状的吻合细支。

(7)根管系统部位连接处,称为"口",冠以同管名,例如根管或副根管在髓室底处称为根管口或副根管口;根管侧支或根尖分歧在根管的连接处称为根管侧支口或根尖分歧口。

(8)根管系统各部在牙根表面的开口处,称为"孔",例如根管的开口称为根尖孔,副根管的开口称为副孔,其余管道的开口处称为侧孔。

我们认为皮昕等的根管系统各部的命名是较完整而合适可行的,因而推荐采用这种命名,有助于统一名称,既有共同语言,又可相互交流。

(史俊南)

第四节　恒牙和乳牙的髓腔应用解剖

恒牙和乳牙的髓腔解剖,与牙髓治疗有极其密切的关系。髓室部分,较为简单,但根管则较为复杂,尤其是后牙。对于所有解剖上的变异,虽不可能全部记忆,但对每一牙齿的通常情况、根管数和牙的大致长度等,必须熟悉。

一、恒牙的髓腔应用解剖(表 1.24)

(一)上颌中切牙

髓室与牙冠的外形相似,从唇舌面观察,在切缘侧最宽,逐渐向颈部缩小;从近中、远中面观察,在切缘侧最窄,逐渐向颈部扩大,在舌面隆凸处最宽,然后向颈部又缩小。这种形态与开髓的洞口形状和大小很有关系。初萌出的牙有 3 个髓角,以后随年龄增长,髓角逐渐消失。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

根管呈圆锥状，均为单管，通常较大且直，自牙颈部至根尖，逐渐缩小。主孔在根尖的有55.45%。在所有牙中，上颌中切牙的副孔最少。牙根尖位于唇侧骨板下，与鼻腔间尚有一段距离，施行尖周外科手术的，易于到达，一般无穿通至鼻腔的危险。

表1.24 恒牙的长度(mm)

牙别	平均	最长	最短
11,21	22.8	30.0	17.3
12,22	21.5	26.3	16.1
13,23	25.2	32.3	17.7
14,24	20.5	25.3	16.0
15,25	20.5	25.5	16.3
16,26	19.7	23.7	16.1
17,27	19.3	23.6	15.5
18,28	17.9	22.5	14.6
31,41	19.9	23.0	14.4
32,42	21.0	25.1	16.9
33,43	24.6	31.1	19.9
34,44	20.9	24.9	15.5
35,45	20.5	26.0	16.1
36,46	20.5	25.5	16.5
37,47	19.1	24.6	16.0
38,48	18.0	21.4	15.1

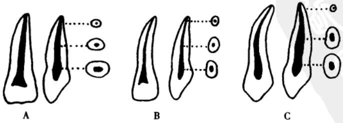
注：引自王惠芸《牙体解剖生理学》，1958

(二)上颌侧切牙

髓腔大致与上颌中切牙相同，但较细小。初萌出的也有3个髓角。根尖部常弯曲。主孔的直径比上颌中切牙小，在根尖的有62%。副孔比上颌中切牙稍多。上颌侧切牙有时在舌面有畸形舌窝或畸形舌尖，有的甚至套叠成牙中牙；或有畸形牙根，有的在舌侧从舌窝起至根尖卷叠成沟，这些都易致龋损、牙髓坏死或慢性尖周炎。根尖也接近唇侧骨板，但比上颌中切牙稍向舌侧，与鼻腔间也有一段距离。

(三)上颌尖牙

髓腔在切缘侧窄小，在舌面隆凸处最大，以后向根尖部逐渐缩小。有一个髓角。根管为圆锥状，较粗大。主孔比上颌中切牙小，但比上颌侧切牙大，约有半数以上在根尖。约1/3的牙有副孔，最多的达10～12个。根尖接近唇侧骨板，但牙根长，故根尖在唇沟以上，且正在尖牙隆凸下，尖周外科手术时较为困难(图1.11)。



A.上颌中切牙 B.上颌侧切牙 C.上颌尖牙

图1.11 上颌前牙的髓腔解剖(近中远中剖面、唇舌剖面、牙根横剖面)

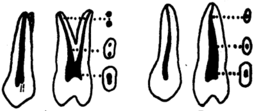
PDG

（四）上颌第一前磨牙

髓室大致为长方体，颊舌径宽而近中、远中径窄。在牙颈部处，近中、远中径显著缩小，在预备髓腔时，如牙钻方向不当，易在该处穿孔。有两个髓角，颊侧髓角较舌侧髓角长。髓室底在颈线之上（向根尖侧）。通常有1～2个根，少数有3个根。根管多为2个，但也有1个或3个的，变异较多。两管常平行，舌管较大，易于通入。如有3管，则为颊二舌一，颊管均较细。主孔直径较小，约半数在根尖。2/5的根管有副孔。

（五）上颌第二前磨牙

髓室与上颌第一前磨牙相似，颊舌径宽而近中、远中径窄，在牙颈部尤为显著。髓室底也在颈线之上（向根尖侧）。根管有1～2个，但单管的较多，有3管的极少数。主孔约有半数在根尖，副孔比其他牙均多，约1/2的根管都有副孔。根尖常接近上颌窦，施行尖周外科手术时应注意（图1.12）。



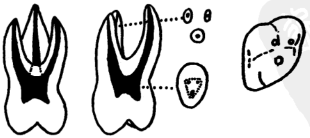
A. 上颌第一前磨牙　　B. 上颌第二前磨牙

图1.12　上颌前磨牙的髓腔解剖（近中、远中剖面、唇舌剖面、牙根横剖面）

（六）上颌第一磨牙

髓室与其冠部外形相似；有4个髓角，在𬌗侧，颊舌径稍宽于近中、远中径，但近中、远中径向颈部即逐渐缩小，而近中侧尤为显著。髓室顶略呈菱形，但至髓室底即为狭长的三角形，底在颊侧，尖在舌侧，且在颈线之上（向根尖侧）。这种髓室在𬌗侧至颈侧的形态显著改变，与开髓和预备髓腔时关系极为密切，如牙钻方向不当，极易在近中颈部穿孔。通常有3根，各有1根管，舌管较大而直，斜向舌侧，易于扩展，分成两管的罕见。远中颊根管较窄，大致为圆形，略斜向远中。近中颊根管小，且常成扁圆形，约有1/3～1/2又分为颊、舌两管，但其中有些在根尖处汇合而只有一个根尖孔。主孔在根尖的只有2/5，根管有副孔的仅有1/4。

（七）上颌第二磨牙



A. 上颌磨牙近中远中剖面　B. 上颌磨牙颊舌剖面　C. 上颌磨牙牙根横剖面　D. 上颌磨牙𬌗面

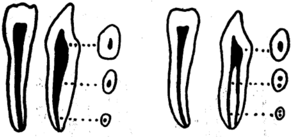
图1.13　上颌磨牙的髓腔解剖

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

髓腔与上颌第一磨牙相似，但较小，且根较直而靠拢，不如上颌第一磨牙那样展开。通常有 3 个根管，远中颊根管口比近中颊根管口远离颊侧。主孔有半数不在根尖，根管有副孔的也仅有 1/4(图 1.13)。

(八)下颌中切牙和侧切牙

髓室形态与上颌切牙相似，但较细小。牙颈部的近中、远中径显著缩小，预备髓腔时，极易在近中或远中颈部穿孔。牙根有时为扁圆状，大约有 10%分为唇、舌两管。主孔约半数在根尖，约 20%的根管有副孔。根尖较接近舌侧骨板，故尖周外科手术时较为困难(图 1.14)。



A　　B

A.下颌中切牙　　B.下颌侧切牙

图 1.14　下颌切牙的髓腔解剖(近中远中剖面、唇舌剖面、牙根横剖面)

(九)下颌尖牙

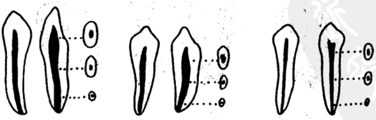
髓腔形态与上颌尖牙相似，但较小。通常为单根单管，双管的很少，此与 Hess 的报告相差很大。有极少数的分为唇、舌两根，即有两管。主孔半数不在根尖，副孔数也与上颌尖牙相似。

(十)下颌第一前磨牙

髓室的颊舌径比近中、远中径宽，颊尖显著高于舌尖，因而颊侧髓角明显，舌侧髓角则不明显。有些牙在殆面有畸形中央尖。根管通常为单管，但也有 2～3 管的。主孔有 61%不在根尖，副孔较多。

(十一)下颌第二前磨牙

髓腔形态与下颌第一前磨牙相似，但两个髓角均很明显，舌侧髓角仍较低，有时则有 3 个髓角。殆面有畸形中央尖的比第一前磨牙多。一般为单根管，主孔不在根尖的约占半数，副孔也较多(图 1.15)。



A　　B　　C

A.下颌尖牙　　B.下颌第一前磨牙　　C.下颌第二前磨牙

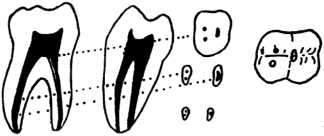
图 1.15　下颌尖牙和前磨牙的髓腔解剖(近中远中剖面、唇舌剖面、牙根横剖面)

（十二）下颌第一磨牙

髓室大致为立方体，近中远中径比颊舌径稍大。舌尖比颊尖高，因而其下的髓角也较高。髓室底在颈线之下（向根尖侧），较大。通常有清晰的近中和远中两个扁圆形的根管口，近中根管口较扁，稍下即分为近中颊和近中舌两管，均较小。远中根管口较大，根管也大，有时可分为颊、舌两管，舌管则较小。主孔不在根尖的约为3/5，约1/4的根管有副孔，比前磨牙少。

（十三）下颌第二磨牙

髓室有的与第一磨牙相似，但髓室底在颈线之下（向根尖侧）更为明显，髓室底至秴面与至根尖的距离，往往相等。由于髓室底较小，故两根管口常较近，不似第一磨牙的两根管口分开较远。有时为3根，即近中根分为颊、舌两根，各有1根管。有时根合并呈马蹄形（C形），根管口也为马蹄形（C形），这种根管的变异情况较多，有的仍为近中、远中两管，有的二者相通。有少数为单根，根管只有1个。主孔不在根尖的和副孔情况均与下颌第一磨牙相似（图1.16）。



A. 下颌磨牙近中远中剖面　B. 下颌磨牙颊舌剖面　C. 下颌磨牙牙根横剖面　D. 下颌磨牙秴面

图1.16　下颌磨牙的髓腔解剖

二、乳牙的髓腔应用解剖（表1.25）

乳牙的髓腔形态也与牙齿外形相似，但从牙齿比例而言，髓室均较恒牙大（图1.17）。

表1.25　乳牙的长度（mm）

牙别	平均长度（mm）
51,61	16.9
52,62	16.5
53,63	18.4
54,64	14.2
55,65	16.1
71,81	16.3
72,82	16.1
73,83	18.0
74,84	15.7
75,85	16.6

注：引自王惠芸《牙体解剖生理学》，页26，1958

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

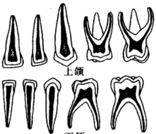


图 1.17 乳牙的髓腔解剖

注:引自皮昕《口腔解剖生理学》,页 43,1979

(一)上颌乳切牙

髓室在切缘侧近中、远中径较唇舌径大,向颈部则逐渐改变为唇舌径大于近中、远中径。单根管,管径也较小,到根尖部方缩小。

(二)上颌乳尖牙

髓室大,根管呈圆锥状。

(三)上颌乳磨牙

髓室大致为立方体,较大,第二乳磨牙尤大。髓室底明显,有 3 个根管,都随牙根外形而弯曲,舌根管较小。

(四)下颌乳切牙

牙体小,髓室也小,根管呈圆锥状。

(五)下颌乳尖牙

髓室比下颌乳切牙大,根管也呈圆锥状。

(六)下颌第一乳磨牙

髓室大,有两个髓角,颊侧髓角比舌侧髓角高。髓室底明显,有两个根管口,但近中根管口下常分为两个根管。

(七)下颌第二乳磨牙

髓室比第一乳磨牙大,髓室底也更明显。远中根管口大,根管粗,也常分为两管。近中根常有两个根管,较小。

(吴友农)

参考文献

1. Hess W. Formation of root canals in human teeth. J Am Dent Assoc. 1921;8:704,709
2. Okumura. Anatomy of the root canals. J Am Dent Assoc. 1927;14:632
3. Skiller WG. Morphology of root canals. J Am Dent Assoc. 1932;19:719
4. Mueller AH. Anatomy of root canals of incisors, cuspids and bicuspids of permanent teeth. J Am Dent Assoc. 1933;20:1301
5. Mueller AH. Morphology of root canals. J Am Dent Assoc. 1936;23:1698
6. Grossman LI. Root Canal Therapy 3rd edi. London:Henry Kimpton, 1950,页 29
7. Kuttler Y. Microscopic investigation of root apexes. J Am Dent Assoc. 1955;50
8. Green D. Morphology of the pulp cavity of the permanent teeth. Oral Surg. 1955;8(7):743

9. Green D. A stereo – binocular microscopic study of the root apices surrounding areas of 100 mandibular molars. Oral surg. 1955;8:1298
10. Green D. A steromicroscopic study of the root apices of 400 maxilary and mandibular anterior teeth. Oral Sury. 1956;9(11):1224
11. Meyer W. Dental anatomy, histology and physiology. Intern. Dent J. 1957;7:260
12. 王惠芸. 牙体解剖生理学. 北京:人民卫生出版社,1958,页 23
13. 史俊南、赵皿、蔡绍惠. 1 400 个恒牙根尖解剖的初步研究. 中华口腔科杂志. 1964; 10(5):320
14. 王晓仪、周来生、梁景平等. 前牙根尖孔位置的临床意义. 中华口腔科杂志. 1985;20(3):164
15. 刘乃妤、张悟颖. 关于变异根管名称的讨论. 口腔医学纵横. 1985;1(2):17
16. 宗兰君、丁毅、虞宁娜等. 恒牙根尖孔的扫描电镜观察. 中华口腔医学杂志. 1987;22(2):104
17. 陈中. 上颌前牙根尖孔的显微解剖研究. 口腔医学纵横. 1988;4(1):7
18. 徐剑青. 牙髓腔与牙本质的增龄变化. 中华口腔医学杂志. 1988;23(5):317
19. 卜维亚. 恒牙根管的研究. 实用口腔医学杂志. 1988;4(3):133
20. 吴友农综述. 根管形态的复杂性及其临床意义. 国外医学口腔医学分册. 1990;17(1):11
21. 张清、吴民凯、马惠平. 204 颗下颌侧切牙及第一双尖牙根管情况的调查. 现代口腔医学杂志. 1990;4(4):229
22. 张志良、李萍、吴伟铭等. 上颌第一前磨牙根管的 X 线研究. 临床口腔医学杂志. 1990;6(3):136
23. 皮昕、陈中、李春芳. 恒牙根尖孔的位置及其临床意义. 中华口腔医学杂志. 1990;25(5):299
24. 中国人民解放军乌鲁木齐总医院、新疆喀什地区人民医院口腔科. 维吾尔族人牙内层解剖的测量分析. 中华口腔医学杂志. 1992;27(1):53
25. 李雨琴、陈胃达、胡建英等. 恒前牙主根尖孔位置的研究. 现代口腔医学杂志. 1992;6(1):46
26. 张翠贤、郭敬俊、王宇. 磨牙髓腔解剖研究及其临床意义. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1994;4(2):78
27. 江茂霞、杜昌连. 切牙髓腔近远中径的测定. 口腔医学纵横. 1994;10(4):228
28. 吴友农、岳保利. 1 769 个恒牙根管系统的形态学研究. 实用口腔医学杂志. 1995;11(2):98
29. 岳保利、吴友农. 中国人恒牙及根管形态图谱. 西安:世界图书出版公司. 1995
30. 皮昕、李春芳、李秋华. 上颌第二前磨牙根管和根尖孔解剖及其临床意义. 临床口腔医学杂志. 1995;11(1):2
31. 卢华芳、顾乐平、慧燕等. 离体恒牙根尖孔的观测及临床意义. 现代口腔医学杂志. 1995;9(2):98
32. 王忠桂. 218 颗上颌第一恒磨牙根管的临床观察. 上海口腔医学. 1996;5(3):135
33. 皮昕、李春芳、顾永春. 根管系统各部分命名之管见. 口腔医学纵横. 1996;12(3):144
34. 张翠贤、王宇、袁渝萍. 再论磨牙髓腔解剖研究及临床意义. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1997;7(1):32
35. 王凯、何权敏、杨杰. 上颌第一恒磨牙的根管观察及临床意义. 北京口腔医学. 1999;7(3):139
36. 朱蔷、李加志、张文清. 上颌第一恒磨牙的根管观察及根尖孔的观察. 广东牙病防治. 2001;9(1):16
37. 顾永春、皮昕. 200 颗恒磨牙髓室底的解剖形态. 临床口腔医学杂志. 2001;17(4):259
38. 陈永进、张日文、李鸿波等. 下颌切牙根管形态特征的研究. 实用口腔医学杂志. 2002;18(3):263
39. 唐道鹤、谢华、周磊等. 上颌恒磨牙根管系统形态学比较. 现代口腔医学杂志. 2002;16(4):324
40. 唐道鹤、谢华、周磊等. 下颌恒磨牙根管系统形态学比较. 现代口腔医学杂志. 2002;16(3):219
41. 顾永春、皮昕. 下颌第二磨牙根管的解剖形态研究. 临床口腔医学杂志. 2002;18(3):167
42. 顾永春、皮昕. 3 803 个恒牙根管的解剖形态研究人. 临床口腔医学杂志. 2003;19(5):276
43. 崔剀、汪平、王宇等. 离体下颌前磨牙根管及牙根形态研究. 临床口腔医学杂志. 2004;20(6):332
44. 皮昕. 口腔解剖生理学. 第 4 版. 北京:人民卫生出版社,2004,页 34,页 43

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

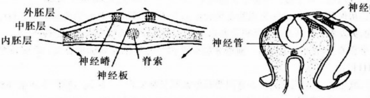
第二章 牙髓胚胎学

第一节 牙乳头的形成

牙齿的发育是原口腔上皮与上皮下外胚间充质之间相互作用的结果。首先产生20个乳牙胚，随后产生28～32个恒牙胚。每个牙胚的发育有其特定的解剖部位，但所有牙胚发育的基本过程是相同的。

一、牙胚的形成及其组织来源

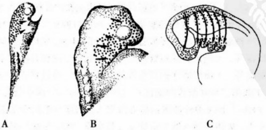
外胚间充质(ectomesenchyme)来源于神经嵴细胞，在口腔颌面部各组织和牙齿的发育中起着重要的作用。在精卵结合后第3周，胚胎尾端中线上的外胚层细胞增生，移向腹侧，在内外胚层之间形成一个细胞索，称为原条(primitive steak)。原条的出现是中胚层形成的开端，同时也标志着胚体头尾方向的分化。原条头端的细胞迅速增生，外胚层细胞不断分裂，在内外胚层之间沿中线向头端增生，形成一个实心的细胞柱，称为脊索(noto chord)。在脊索的诱导下，位于头侧背部中线上的外胚层细胞增生，形成一个增厚的神经板(neural plate)；神经板边缘隆起，进一步形成神经嵴(neural crest)，其中央凹陷部分形成神经沟(neural groove)(图2.1)。



A. 神经嵴的形成　　B. 神经管的形成

图2.1　胚胎早期神经管的形成过程

此后神经嵴逐渐闭合，形成神经管(neural tube)，在神经管形成之前，神经嵴细胞沿着头部两侧发生广泛的移动，形成外胚间充质(图2.2)。



A. 神经嵴细胞从胚胎背部中线向腹侧广泛移动(箭头示)　B. 神经嵴细胞已移行至额鼻突和鳃器官中
C. 神经嵴细胞移行的全过程

图2.2　神经嵴细胞(大黑点表示)的移动和外胚间充质的形成

外胚间充质在诱导以及参与牙齿形成过程中发挥着重要作用。在实验中对鼠的胚胎进行观察，将磨牙区外胚间充质与其表面的上皮分离，再与切牙区的上皮结合，其结果形成磨牙。这一结果说明了外胚间充质在牙齿发育过程中的主导作用。有证据表明，在牙齿发育过程中，决定牙胚发生的起始信号首先存在于口腔上皮中，这一阶段上皮是起指导作用的成分。但一旦牙齿发育开始，决定牙胚发育的信号逐渐由上皮转向间充质，此时外胚间充质就起重要的主导作用。有实验证实，早期牙胚的外胚间充质与皮肤的表皮结合后，皮肤表皮就会发育成成釉器，最后形成牙齿。

在胚胎发育至第6周左右时，牙齿的发育开始，首先是原口腔上皮的基底层细胞在未来牙槽突区受其深部外胚间充质的诱导而增生。此后在特定位点上进一步增生、伸长形成牙板(dental lamina)，这就是牙齿外胚层部分的原始组织基，由此进一步发育成成釉器(enamel organ)；在成釉器逐渐成熟过程中，其周围的外胚间充质受其影响，增生、分化并形成牙乳头(dental sac)。成釉器、牙乳头和牙囊共同组成牙胚，这是形成牙体牙周组织的基本组织器官，其中，成釉器形成釉质，牙乳头形成牙髓和牙本质，牙囊形成牙骨质、牙周膜和固有牙槽骨。

二、牙乳头的形成和凝聚区的概念

几乎所有器官的早期形态发生都有相同的或相似的特点，表现为间充质细胞的凝聚和上皮层外形的变化，间充质细胞的凝聚是形态发生的关键。

骨骼组织的发育起源于一系列组织细胞的移行、聚集、识别和分化。最基本的以及早期的骨形成是成纤维细胞样细胞(间充质细胞)的聚集和复制，并形成细胞凝聚区(condensation)，在凝聚区的细胞进一步产生细胞外基质并分化为软骨或骨，凝聚区决定了未来骨骼的基本外形。

在颅颌面部，凝聚区细胞来源于神经嵴细胞，这些神经嵴细胞在移行至特定区域后与原有的中胚层构成外胚间充质，在邻近的胚胎性上皮的作用下形成细胞凝聚区，这是骨骼发育的前提和关键。很多影响骨骼发育的基因突变即出现在这个时期。细胞凝聚区的形态和大小未达到正常可以出现：①成骨和成软骨延迟而产生小骨；②邻近的凝聚区未能分隔或发生融合而导致骨骼形态异常，也可能是凝聚区内细胞间的相互作用异常的原因；③由于凝聚区未达到最小的域值而造成骨和软骨的完全缺失。有研究显示凝聚区决定了其中的细胞向成骨或成软骨细胞的分化，而分子信号在细胞凝聚区的形成中发挥调控作用。新近的研究显示：在有骨骼发育畸形的短足小鼠中，发现了明显的凝聚区异常以及相应的基因突变。

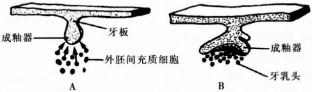
牙齿的发育也基本上遵循上述原则，原口腔上皮与来源于神经嵴细胞的外胚间充质的相互作用，启动和主导了牙齿发育的过程。在这一过程中原口腔上皮形成牙源性上皮，外胚间充质细胞发生移行、识别、聚集和增生，转变为发挥主导作用的细胞凝聚区，即牙乳头和牙囊。在这一阶段，出现了活跃的分子信号传递和基因调控。

由牙板末端的上皮细胞增生形成成釉器，成釉器的发展由于其细胞的构成、形态和功能状态的不同而分为蕾状期、帽状期和钟状期，牙乳头的形成是伴随成釉器的生长成熟而逐渐形成的。

牙板是牙齿发育中出现的早期的组织学表现，由原口腔上皮的基底层细胞增生，在上

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

皮下的外胚间充质中进一步伸长，并进而形成蕾状期成釉器，在成釉器的萌芽开始形成时，围绕着成釉器邻近区域的外胚间充质细胞增生活跃，这是牙乳头形成的最早期阶段(图 2.3A)



A. 蕾状期成釉器，外胚间充质细胞在成釉器底部移行和增殖　B. 帽状期成釉器，构成牙乳头的外胚间充质细胞增生

图 2.3　牙胚成釉器的早期阶段

随着成釉器细胞的生长分化，形成帽状期成釉器，这时的成釉器较前期变大，基底部向内凹陷，形似帽子(图 2.3B)。在帽子底部外胚间充质细胞增生更为明显，数量急剧增多，形成细胞凝聚区，在组织学可见到成釉器的帽子相对应的乳头状结构，故称为牙乳头(图 2.4)。牙乳头被成釉器凹陷部分包围，二者之间有基底膜相分隔。此时的组织学显示，牙乳头含有丰富的毛细血管网以及逐渐增多的结缔组织和纤维。

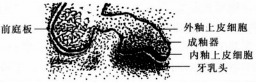


图 2.4　牙齿发育的帽状期成釉器，牙乳头的形成

增生的未分化间充质细胞出现增多的核分裂相。成釉器进入钟状期已成熟，此时成釉器的细胞分为 4 层，由外表面至内分别为外釉上皮细胞层、星网层、中间细胞层和内釉上皮细胞层。内釉上皮细胞层为单层上皮细胞，位于成釉器内凹面上，与牙乳头由基底膜相隔，内釉上皮细胞开始呈矮柱状，到分化成熟时呈高柱状。分化成熟的内釉上皮细胞称为成釉细胞(ameloblast)，位于牙尖、切缘等处的内釉上皮细胞最先成熟。成釉细胞出现后并不直接产生釉质，而是诱导其邻近区域的牙乳头细胞分化。在钟状期成釉器时，牙乳头细胞数量进一步增多，位于生长中心附近的外胚间充质细胞最先受到成釉细胞的诱导，分化为高柱状的成牙本质细胞(odontoblast)。这些细胞在生长中心处为柱状，在牙颈部为立方状。出现成牙本质细胞后，牙本质的形成即开始，当牙本质开始形成后，成釉细胞也开始形成釉质。釉质和牙本质形成有极严格的规律性和节拍性，交叉进行，釉质的形成从基底膜向外生长，牙本质的形成从基底膜向内生长。在牙本质和釉质完全形成后，牙乳头也随之转变为牙髓。

三、牙乳头在牙体组织形成中的作用

牙乳头是牙齿发育中重要的凝聚区，在牙齿发育中有着重要作用，牙乳头是决定牙齿形状的重要因素。有实验证实：将切牙的成釉器与磨牙的牙乳头重新组合，其结果形成磨牙；而将切牙的牙乳头与磨牙成釉器重新组合，其结果可形成切牙。这种相互之间的诱导

作用显然是通过细胞之间的某种沟通来实现的。但这并不意味着一定要细胞与细胞发生直接的接触。

有研究表明：位于内釉上皮细胞层与牙乳头之间的基底膜出现小孔和不连续，这样使得位于基底膜两侧的已成熟的成釉细胞和极性化的牙乳头表面的成牙本质细胞前期细胞（preodontoblast）或成牙本质细胞相接触。成釉细胞、成牙本质细胞的最终分化依赖于特定的胞膜或（和）胞浆的相互接触，此外还依赖于细胞外成分（extracellular components），如生长因子的作用。近年来的研究证实了这些生长因子，如骨形成蛋白家族成员（bone morphogenetic protein，BMPs），转化生长因子 β（transforming growth factor β，TGF－β），胰岛素样生长因子－Ⅰ、Ⅱ（insulin－like growth factor－Ⅰ、Ⅱ，IGF－Ⅰ、IGF－Ⅱ），成纤维细胞生长因子（fibroblast growth factor，FGF）以及转录因子 Msx 等在这种细胞间的相互诱导分化、细胞增殖调节以及细胞成熟过程中发挥着重要作用。目前已可以从牙本质牙髓复合体中提纯这些生长因子，还可以用免疫细胞化学、原位分子杂交等方法显示这些因子在成釉细胞、成牙本质细胞分化、增生、成熟过程中的细胞内定位。

目前的观点认为：原口腔上皮基底层细胞的增生并形成牙板这一过程，受到其底部外胚间充质的诱导；在成釉器形成和发育过程中，成釉器上皮与其邻近的外胚间充质也存在相互诱导。一旦牙胚形成，牙乳头发挥更为重要的作用，牙乳头细胞可促进内釉上皮细胞的成熟，牙乳头细胞的分化、成熟又受到成釉器上皮的诱导，而牙齿的形态和构成又很大程度上取决于牙乳头。

在牙根形成过程中，牙乳头细胞也随之广泛增生，并由此产生压力，从而有助于牙周组织的形成和牙齿的萌出。位于上皮隔与成釉器之间的牙乳头细胞的增生，将上皮隔推向牙乳头的底部，同时将成釉器推向冠方，其结果是拉长了颈环处的内外釉上皮形成的上皮根鞘，并使其在一定时间后断裂成赫特威上皮根鞘（Hertwig's epithelial root sheath）。上皮根鞘的断裂使得牙囊中的外胚间充质细胞立即进入断裂的上皮细胞之间，与已形成的根部牙本质表面接触，并在该处分化出成牙骨质细胞（cementoblast），产生牙骨质。

此外，牙乳头高度血管化，丰富的血供不仅为其自身提供充足的营养，而且也为成釉器和牙体组织的形成提供了营养成分。

第二节 牙髓的形成

来源于外胚间充质的牙乳头是产生牙髓的原始组织。当牙乳头周围一旦有牙本质（即前期牙本质）形成时，相应邻近部位的牙乳头转变为牙髓。随着牙本质不断形成，成牙本质细胞向中心移动，牙乳头的体积逐渐减小，原发性牙本质完全形成，余留在髓腔的牙乳头即全部转变为牙髓。

早期的牙髓，血管丰富，细胞成分多，牙乳头的未分化间充质细胞分化为多突起的星形细胞，这就是牙髓细胞。牙髓的形成和成熟的基础是细胞出现极性、细胞重排、细胞外基质和胶原的形成以及重新分布。在早期牙髓形成时，无髓交感神经就已出现；有髓交感神经的长入是在根部牙本质发育到一定阶段后开始的，因此，发育中的牙齿是无感觉能力的。牙髓的神经来源于上、下牙槽神经，无论是有髓神经，还是无髓的交感神经都是伴随着牙乳头或牙髓的血管进入牙髓的。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

细胞能按照预先编好的程序作出发育选择,沿着特定细胞类型,向决定好的方向分化,因此,决定先于分化,并制约着分化的方向。

随着分子生物学的发展,人们由细胞水平深入到分子水平,并从分子水平认识分化细胞的决定,发现与分化密切相关的一组分子,称之为决定分化的分子决定族(molecular determinants)。

在牙髓发育和分化过程中,分子决定族如细胞黏附分子(CAMs)、基质黏附分子(SAMs)和组织特异结构基因产物的表达是人们研究的焦点,因为这些分子出现或消失存在着时间和空间上的特异性,并且与牙髓组织细胞的分化密切相关(表 2.1)。最新的研究表明:牙髓组织是来源于外中胚层,而不单是中胚层(图 2.5)。

颅神经嵴

↓

外胚间充质细胞

↓

牙乳头外胚间充质细胞→牙髓干细胞

↓　　↓

牙髓成纤维细胞和成牙本质细胞

↓

牙髓细胞形成牙本质

图 2.5　小鼠牙髓细胞分化示意图

表 2.1　牙齿发育中分子决定族的表达

Theilar 阶段	发育过程	决定分子
15	中脑和菱脑神经嵴迁移	CAMs 和 SAMs
16	中颌突融合和中线建立	CAMs 和 SAMs
18	双侧磨牙位置确定(立体异构现象)	CAMs 和 SAMs
20	牙板	—
20 ~ 23	蕾状期	CAMs 和 SAMs
23 ~ 25	帽状期	DPP, GLA - 蛋白
	成牙本质细胞分化(牙本质形成启动)	
	内釉层分化(牙釉质形成启动)	
26	钟状期	
	细胞外基质生物矿化启动	釉质蛋白(带负电荷)
27	—	—

釉质上皮形态发生过程中的主要变化出现在上颌第一磨牙的帽状和钟状期,如 tenascin(SAM),免疫组化染色结果与成牙本质细胞分化相反。颅神经嵴源性外中胚层细胞为 tenascin 染色阳性,分化成成牙本质细胞后,细胞染色为阴性。因此, tenascin 能够作为一个决定分子,确认神经嵴源性和早期牙齿外中胚层细胞亚群,这种识别早于牙乳头形成期,也先于成牙本质细胞分化。

第一磨牙成牙本质细胞分化过程中,纤维黏连蛋白(fibronectin, Fn)和Ⅲ型胶原的表达不断减少甚至消失,而Ⅰ型胶原成为成牙本质细胞特征性和主要基因产物,并且构成了牙本质基质的主要有机成分。

牙齿发育过程中,成牙本质细胞表达Ⅰ、Ⅴ型胶原及Ⅰ型胶原同型体、几种蛋白多糖、

糖蛋白、氨基多糖、骨钙素(GLA－蛋白)和牙本质磷蛋白(DPP),进而形成牙本质基质。DPP是特异性的生化标志。

在外源性因子存在下,条件培养液仍可使牙齿发育,细胞分化和胞外基质矿化在体外进行。因此可以推测,除去血清中的生长调节因子,胚胎组织可以产生内源性自分泌和(或)旁分泌因子(如TGF－β、EGF、IGF、FGF、视黄醇和视黄酸),进而在体外介导牙齿发育。

成牙本质细胞分化时,tenascin免疫组化染色丢失,而DPP染色阳性,提示tenascin可能参与调控成牙本质细胞的分化。在蕾状期和帽状期主要形态发生期间,Fn和Ⅲ型胶原相伴表达,它们是外中胚层何时何处诱导外胚层形态发生的标志物。

综上所述,来源于神经嵴外中胚层的牙髓组织分化期间,CAMs、SAMs和组织特异标志物参与这一复杂的过程,目前认为tenascin、DPP、Fn、胶原和生长因子是主要的分子决定族,它们存在的时空特异性与牙髓组织的分化密不可分。随着研究的深入,人们会发现更多的分子决定物,最终从分子水平阐明牙髓组织细胞的分化。

(金　岩)

参考文献

1. Thesleff I, Hurmerinta K. Tissue interaction in tooth development. Differentiation. 1981; 18: 75
2. Butler WT, Brown MT, DiMuzio MT, et al. Multiple forms of rat dentin phosphoprotein. Arch Biochem Biophys. 1983;225:178
3. MacDougall M, Zeichner－Davin M, Slavkin HC. Production and characterization of antibodies against murine dentin phosphoprotein. Biochem J. 1985a; 232: 493
4. MacDougall M, Zeichner－Davin M, Bringas P, et al. Dentin phosphoprotein expression during in vitro mouse tooth organ culture. In Butler WT(ed): the Chemistry and Biology of Mineralized Tissue. Birmingham, AL: EBSCO Media. 1985b;177－181
5. Chiquet－Ehersmann R, Mackie EJ, Pearson CN, et al. Tenascin: An extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. Cell. 1986; 47:131
6. De Vries IG, Quartier E, Boute P, et al. Immunocytochemical localization of osteocalcin in developing rat teeth. J Dent Res. 1987; 66:784
7. Slavkin HC. Molecular determinants during dental morphogenesis and cytodifferentiation: A review. J Craniofac Genet Dev Biol. 1991;11:338
8. Butler WT, Ritchie H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. Int J Del Biol. 1995; 39:169
9. Hao Jianjun, Shi Junnan, Niu Zhongying, et al. Mineralized nodules from human dental papilla cells in vitro. Eur J Oral Sci. 1997;105:
10. 郝建军、史俊南、牛忠英 等.碱性成纤维细胞生长因子对体外大鼠牙胚分化的影响.牙体牙髓牙周病学杂志. 1997;7(3):180

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

第三章　牙髓组织学

第一节　牙髓的组织结构

牙髓(pulp)是牙体组织中唯一的软组织,位于牙髓腔内,为外胚间充质来源的疏松结缔组织,除根尖孔外,其周围被牙本质所包围。牙髓中的血管、淋巴管和神经均通过根尖孔与根尖部的牙周组织相连接。

一、牙髓的形态学结构

牙髓在牙冠部的称冠髓(coronal pulp),在牙根部的称根髓(root pulp 或 radicular pulp)。在冠部,随着切缘或牙尖的形态,牙髓形成髓角(pulp horns),根髓通过根尖孔与根尖周和牙周组织交通,并随着牙根的数量而分为若干条。

牙髓的平均容积为 0.02 mL,磨牙牙髓的体积将近 4 倍于切牙牙髓的体积。当牙齿萌出完成后,牙髓根据生理功能的特点分为 4 个层次:

(一)成牙本质细胞层(odontoblastic zone)

成牙本质细胞层位于牙髓最表面,主要由成牙本质细胞的胞体构成,其胞浆突起构成了牙本质小管内的突起。成牙本质细胞层与前期牙本质紧密相连,是形成牙本质的细胞成分。

在成牙本质细胞之间可见毛细血管、神经纤维和少量的树突状细胞。

(二)乏细胞层

或称无细胞层(cell - free zone),也称魏尔(Weil)层(the zone of Weil),乏细胞层位于成牙本质细胞层的牙髓侧,在冠部牙髓最明显。乏细胞层厚约 40μm,介于成牙本质细胞层与多细胞层之间,细胞成分很少,含有丰富的毛细血管和无髓神经纤维。

(三)多细胞层(cell - rich zone)

多细胞层的牙髓侧,细胞密集,此层也在冠髓最为明显。多细胞层由密集的成纤维细胞构成,并可见少量的巨噬细胞和淋巴细胞。多细胞层与牙本质 - 牙髓复合体的修复再生有密切关系。在成牙本质细胞受损时,在多细胞层可出现大量核分裂相,并可分化为成牙本质细胞。

(四)牙髓本体(the pulp core)

牙髓本体位于牙髓中央,是牙髓的主体结构,有均匀分布的成纤维细胞,可见伴随而行的神经、血管。

二、牙髓的细胞成分

牙髓是一种疏松结缔组织,它包含有细胞、纤维和细胞外基质。牙髓的细胞成分中有成牙本质细胞、成纤维细胞、组织细胞、未分化间充质细胞、淋巴细胞等多种细胞,不同的细

胞在牙髓的生理、病理状态以及防御中发挥着不同的作用。

（一）成牙本质细胞（odontoblasts）

成牙本质细胞是形成牙本质的细胞，在牙髓中主要为胞体结构，其胞浆突起伸入牙本质小管中。成牙本质细胞的形态在牙髓的不同部位有所变化，在冠部排列成整齐的柱状，核卵圆形，位于细胞的基部；在牙根的中部和近根尖孔处的则呈方形或扁平状。

成牙本质细胞间有类似于上皮细胞的连接方式，为缝隙连接（gap junction）、紧密连接（tight junction）、中间连接（intermediate junction）、桥粒（desmosomes）。

成牙本质细胞的形态学反映了细胞的功能状态：在光镜下，处于功能状态的细胞核大，胞浆略嗜碱，可见高尔基体区（Golgi zone）。处于静止状态的细胞呈扁平状，胞浆少，处于活动期的成牙本质细胞在电镜下胞浆含有丰富的小泡，内质网多，成熟的高尔基体位于胞核的牙本质侧，线粒体散布于整个细胞浆中。核染色质丰富，核仁可多达 4 个。在牙本质形成期，粗面内质网最多，在粗面内质网池内有大量细小的颗粒状物质，形成转移泡后聚集在高尔基体的未成熟面。高尔基体的成熟面有许多分泌小泡，一直分布到胞浆突起的底部。在胞浆中还有一些微管与胞体长轴平行排列，不仅构成细胞的支架，而且参与细胞内物质的转运。

成牙本质细胞突起始于细胞的颈部，在进入前期牙本质时突起变窄。成牙本质细胞胞体与突起的内含结构有较大的区别。

（二）成纤维细胞（fibroblasts）

成纤维细胞是牙髓中的主要细胞，所以又称为牙髓细胞（pulp cell）。细胞呈星形或多角形，有胞浆突起相互连接，核染色深，胞浆淡染而均匀。在电镜下，未成熟的成纤维细胞的细胞器处在发育阶段，高尔基体不明显，粗面内质网少，可见到较多游离的核蛋白体。成熟的成纤维细胞内细胞器丰富，高尔基体增大，粗面内质网多，有分泌小泡。

成纤维细胞的功能主要是形成和维持牙髓基质，基质内含有大量的胶原、基质物质以及一些非胶原蛋白，成纤维细胞除了具有合成胶原等物质的能力外，在受到相应的刺激后也具有消化和分解胶原的能力。

（三）未分化间充质细胞（undifferentiated mesenchymal cells）

未分化间充质细胞，分布于整个牙髓，常常位于血管周围。在光镜下，其体积比成纤维细胞小，呈多边形，胞核相对较大、淡染，位于中央。未分化间充质细胞是牙髓结缔组织细胞的“库”。在受到一定刺激后，这些细胞可以向成纤维细胞或成牙本质细胞分化。在增龄后，牙髓的未分化间充质细胞的数量也明显减少。

（四）免疫活性细胞（immunocompetent cells）

除了与神经和血管相关联的细胞外，在正常牙髓可见 3 种免疫活性细胞：巨噬细胞（macrophage）、树突状细胞（dendritic cell）、淋巴细胞（lymphocyte）。

1.巨噬细胞

在光镜下，巨噬细胞为大的卵圆形或梭形，核和胞浆均深染，偶然也可见胞浆透明区，在电镜下为大的酶体。牙髓中的巨噬细胞为血管内的单核细胞进入组织后形成，具有抗原提呈作用。巨噬细胞还能产生白细胞介素 Ⅰ 等细胞因子，也参与牙髓中坏死细胞的清除工作。在炎症状态下，巨噬细胞不仅清除细菌，而且与其他炎性细胞相互作用。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

2.树突状细胞

正常牙髓中也存在树突状细胞，主要分布于牙髓的外围以及成牙本质细胞层中，其形态学特点主要是细胞有树突状突起。牙髓中的树突状细胞的作用类似于上皮中的树突状细胞，细胞表面有组织相容性Ⅱ类复合体，具有捕获抗原并提呈给T淋巴细胞的功能。

在牙髓中，有大量的树突状细胞和巨噬细胞，可见这两种细胞在牙髓正常代谢、组织细胞更新以及健康中发挥着重要作用。

3.淋巴细胞

正常牙髓中存在有T淋巴细胞和B淋巴细胞，以不同亚类的T淋巴细胞为主。T淋巴细胞与牙髓的免疫防御有密切的关系。正常牙髓中，B淋巴细胞极少。但在炎症状态下，B淋巴细胞可能转变为具有产生抗体功能的浆细胞。炎症牙髓各种淋巴细胞大量增多。

三、牙髓的细胞外基质

（一）牙髓纤维

牙髓间质内主要是胶质纤维和弹性纤维，弹性纤维仅见于大的血管壁。胶原纤维主要为Ⅰ型、Ⅲ型胶原，比例为55:45。Ⅰ、Ⅲ型胶原的这种比例从牙齿发育成熟后基本上是恒定的。研究显示Ⅰ型胶原主要由成牙本质细胞产生，而Ⅲ型胶原则由成牙本质细胞与牙髓成纤维细胞共同产生。胶原的总量随着牙髓发育的成熟而逐渐变多。成熟牙髓的胶原呈束状分布，在根尖端数量最多。

牙髓中的胶原纤维可由银染法染成黑色，因而称为嗜银纤维。嗜银纤维散布于整个牙髓中成牙本质细胞区（牙髓边缘），聚集成粗大的纤维束，称为科尔夫纤维（Korff fiber）。粗大的胶原纤维没有嗜银性，在电镜下，可观察到胶原纤维特征性的64 nm的横纹。

（二）牙髓基质

牙髓基质与其他疏松结缔组织相似，是一种无定形结构的均质样物质。牙髓基质物质主要为氨基多糖、糖蛋白、水，这些物质支持着牙髓中细胞成分，并作为代谢与营养物质运输的媒介。基质中的糖蛋白可协助形成细胞外纤维、基质膜，也可黏附于细胞表面或与其他基质分子结合。当炎症病损中有溶酶体酶、蛋白分解酶、透明质酸酶、硫酸软骨素酶或能产生水解酶的细菌时，基质可以发生降解。基质降解后，炎症范围进一步扩大。

四、血液供给

高志荣、肖明振、史俊南等（1985）用墨汁灌注大白鼠、猴的颈动脉，观察牙髓和牙周的微血管分布。李辉奉、马兵、李祖兵等（1989）也用墨汁灌注后研究狗牙的牙髓血管形态。崔耀庭、张北、屈辉等（1986）对5具男尸，以墨汁灌注后观察人牙髓、牙周、下颌骨微血管形态，均显示牙髓组织高度血管化。牙髓的血管与牙周组织的血管均来自颌骨的牙槽动脉分支，供给牙髓的小动脉和动脉经过根尖孔进入牙髓（即牙髓动脉）后，沿牙髓中轴前进，沿途分出众多的小分支，最后在成牙本质细胞附近形成一浓密的毛细血管丛。然后，毛细血管后的小静脉将血液引流至与牙髓动脉伴行的静脉内，出根尖孔后与牙周组织的静脉一同汇入牙槽静脉。牙髓和牙周组织的血管还通过一些副根管或侧支根管相通。因此，当牙髓或牙周组织发生炎症时，可沿根尖孔、副根管或侧支根管相互扩散。

尽管牙槽动脉的分支供给牙周组织和牙髓，但进入牙髓组织的血管分支结构发生了变

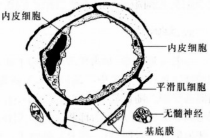


图 3.1　位于牙髓中央区的牙髓小动脉
图示基底膜包绕内皮细胞和平滑肌细胞

化，管壁变薄。来自牙槽动脉的血管在进入根尖孔时管径为 0.3～0.4mm。在牙髓组织中最大的牙髓动脉直径为 50～100μm，与身体其他大部分区域的小动脉相同。这些动脉有 3 层结构：内膜(tunica intima)为相互略有重叠的扁平或立方状内皮细胞，外周包绕有一层基底膜；中膜(tunica media)约 5μm 厚，由 1～3 层平滑肌细胞组成，也有一层基底膜包绕并分隔平滑肌细胞，有时内皮细胞与肌细胞直接接触，形成所谓的"肌内皮结合"(myoendothelial junction)(图 3.1)；外膜(tunica adventitia)由一些胶原纤维组成并与细胞间质的纤维相融合。末梢动脉位于牙髓周边，直径为 10～50μm，在内皮细胞外仅有一层平滑肌细胞围绕；有人将管径更细的小动脉(直径为 8～12μm)称为静脉前小动脉，血管的平滑肌细胞层不完整。静脉较动脉大，直径为 100～150μm，由于在行进过程中弯曲和不规则，其管壁较动脉不规则。这些静脉与同样大小的动脉相比，管壁较薄，内皮细胞扁，胞浆不突向腔内；中膜为 1～2 层平滑肌细胞，在较小的静脉该层不完整或缺乏，无外膜；静脉的基底膜与动脉相比要薄，结构模糊。牙髓毛细血管直径为 8～10μm，仅有一层内皮细胞，部分接近成牙本质细胞的末端毛细血管内皮细胞出现胞浆缺乏的结构，此处只剩胞膜构成桥状连接，外周只有基底膜包绕，这种结构使牙髓可以更快地获得营养物质和进行代谢，尤其在前期牙本质形成和矿化时期。

在牙齿发育过程中，牙乳头形成的初期，微血管的分布较少，绝大多数集中于牙乳头的基部，基部的血管丛与牙囊的血管丛相连接。随着牙乳头的增生和分化，牙乳头中轴部位出现微血管，至钟状期后期，牙乳头的血管分布逐渐增加。在牙本质形成过程中，毛细血管出现在与前期牙本质形成邻近的成牙本质细胞之间并在成牙本质细胞下方形成血管网。胚胎后期的恒牙髓角处出现直径较大的血管。当牙齿发育完成并萌出达咬合平面后，牙本质形成减慢，这时这些血管网又移位于牙髓中央区，在成牙本质细胞层下和冠髓处形成丰富的毛细血管网。

牙髓的血流速比身体其他区域血管的血流速要快得多(表 3.1)，冠髓的血流速要比根髓血流速快近两倍。牙髓血液循环除受局部因素影响外，也受交感神经的调节，在牙髓血管平滑肌细胞上也发现 α 和 β 肾上腺素能的受体。

表 3.1　牙髓血管内血液流速

血管	血液流速(mm/s)
动脉	0.3～1
静脉	0.15
毛细血管	0.08

五、淋巴系统

牙髓中淋巴管常与血管、神经伴行，毛细淋巴管起于牙髓表面，合成较大的小淋巴管，经牙髓腔中部，穿过根尖孔与牙龈、牙周膜的淋巴管丛吻合，前牙区的淋巴流入颏下；后牙区的淋巴流入颌下和颈深部淋巴结。但牙髓的淋巴管在一般组织学上不易与毛细血管相区别，毛细淋巴管由内皮细胞构成管腔，较大的淋巴管管腔不规则，常由内皮细胞和外周不

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

完全的周皮细胞或(和)平滑肌细胞构成,内皮细胞外周的基底膜可有缺损或消失。

六、神经

尽管牙髓很小,只占牙齿体积的 1/4,但牙髓内的神经很丰富。在牙齿发育的早期,就发现神经出现在牙乳头中。最先进入牙乳头中的神经纤维是无髓交感神经纤维,这些神经在成釉器蕾状期即随血管一同进入牙乳头,主要起调节控制血管的作用。有髓神经纤维只是在牙冠已完全形成、牙齿萌出即将开始时期出现在牙髓中央区和牙尖区,随后集中于髓角区域。在牙齿发育的后期,另一些无髓神经进入牙髓。对萌出后的乳、恒牙牙髓内的神经进行追踪观察,可见牙髓神经来自牙槽神经的分支。进入牙髓的神经大多数是有髓神经,传导外界刺激而引发痛觉。少数为与血管关系密切的无髓交感神经,神经末梢位于大血管的平滑肌细胞上,起调节血管收缩和舒张的作用。粗大的牙髓神经在牙髓中基本上沿着血管的行走分布进入根管,到达冠髓后分开进一步呈放射状分布于成牙本质细胞层附近,在靠近多细胞层,神经纤维形成网状或丛状,称为壁层神经丛(parietal neural plexus)。自此层神经轴突通过多细胞层和乏细胞层,止于牙本质 - 牙髓界处的成牙本质细胞突起之间或牙本质小管内。神经末梢为圆形或椭圆形,末端膨大含微泡和小颗粒状物质。这些末梢与成牙本质细胞膜紧密相接,形成感受器(图 3.2)。在成牙本质细胞层、多细胞层和乏细胞层分布的这些神经纤维为无髓神经,只包绕有雪旺氏细胞。推测这些神经纤维是在壁层神经丛中失去髓鞘的。髓角中的神经纤维和末梢的数量要比牙冠其他部位或根部牙髓中的多。

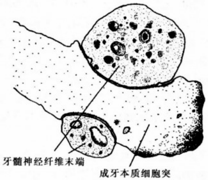


图 3.2 牙髓神经末梢

图示含微泡和颗粒物质的神经末端在近前期牙本质形成处与成牙本质细胞紧密相接

牙髓内的神经在受到外界刺激后,其独特的感受是将冷、热、压力、电或化学刺激均表现为痛觉,这可能是因为牙髓缺乏对这些刺激的感受器。由于牙髓神经缺乏定位能力,所以牙髓炎患者常不能明确指出患牙的部位。

七、牙本质 - 牙髓复合体

由于牙本质和牙髓在胚胎发生、组织形态学结构以及功能上存在着密切的关系,因而有时将二者统称为牙本质 - 牙髓复合体(dentin - pulp complex)。

第二节　乳、恒牙牙髓的区别

除了体积上明显的不同外，乳牙与恒牙的组织学构造基本是相同的。在外观上，血液供给、牙髓结缔组织结构、成牙本质细胞也无明显差别，二者最主要的区别为恒牙牙髓的神经比乳牙的丰富。

乳牙和恒牙牙髓在成熟时期以及行使功能时期有着明显的不同。乳牙牙髓平均存活期为 8.3 年，包括牙髓生长期(pulp organ growth)、牙髓成熟期(pulp maturation)(即牙根发育完成至牙根吸收开始)、牙髓褪变期(pulp regression)(即牙根吸收开始至乳牙脱落)(表 3.2)。

无论是恒牙还是乳牙，在其牙冠形成阶段，牙髓的细胞最为丰富，细胞有丝分裂相多见，尤其是在牙冠的颈部。此外，牙髓高度血管化。

表 3.2　乳牙牙髓各时期持续时间和特征

时期	特征	约需时间
生长期	牙冠发育	11 个月
	萌出至牙根完全形成	1 年
成熟期	牙根形成至牙根吸收开始	3 年 9 个月
褪变期	牙根吸收至乳牙脱落	3 年 6 个月

恒牙由于没有乳牙所必须经过的脱落，因此其牙髓在发育成熟后在牙体组织不受病理刺激的情况下，可伴随人的一生而存在。恒牙牙髓的生长期和成熟期所需时间都比乳牙要长(表 3.3)。

表 3.3　恒牙牙髓各时期持续时间和特征

时期	特征	所需时间
生长期	牙冠发育	5 年 5 个月
	牙冠发育完全至萌出开始	3 年 6 个月
	萌出至牙根发育完全	3 年 11 个月
成熟期	牙根、牙周组织结构和功能正常	终生

第三节　乳牙脱落过程中的牙髓变化

随着儿童年龄的增长，乳牙的数目、大小和牙周组织的支持力量等，都不能适应长大了的颌骨和增强了的咀嚼力。乳牙从 6 岁左右开始发生生理性脱落(exfoliation of the primary teeth, or shedding)，到 12 岁左右乳牙全部被恒牙代替。乳牙脱落的关键是牙根吸收，使乳牙与周围牙周组织失去联系。由于颌骨内位于乳牙根尖舌侧以及根分叉区下方的恒牙胚的生长发育和殆向移动，在恒牙胚与乳牙根之间的结缔组织中产生压力，这种持续的压力使局部组织充血并进一步转化为肉芽组织。位于乳牙根表面的肉芽组织中分化出破骨细胞参与牙骨质的吸收。当牙骨质和牙本质被吸收后，外周的肉芽组织与乳牙牙髓融合，乳牙牙髓也随即转变为肉芽组织，参与对牙髓腔表面牙本质的吸收。

在乳恒牙替换时，乳牙根的吸收部位开始于和恒牙胚接近的部位。在乳前牙常在其根尖 1/3 的舌侧面开始，在乳磨牙位于牙根之间与根分叉处。待乳牙牙根被吸收后，牙齿逐渐松动，牙龈上皮向乳牙根下方增生，这样使得乳牙完全失去与周围组织的联系而脱落。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

第四节 牙髓的增龄变化

增龄性变是每一种机体都无法避免的生理过程。人们把从胚胎到死亡的整个生命过程中机体发生的一切,随时间推移而形成的退行性变化都归属于衰老。而通常所讲的衰老,是指生物体在生命过程中,随年龄增长,在形态结构、生理功能方面出现的一系列慢性、进行性、退行性变化。这些变化导致适应力、储备力日趋下降,这一过程不断发生发展形成衰老。

人们将老年时期那些不可逆的复杂现象,及那些易患致命性疾病乃至死亡的退行性变化称为增龄性变或机体衰老。正常细胞经一定的倍增次数后,失去对促分裂因子的反应,不可逆的丧失增殖能力停止分裂的过程称为细胞衰老。细胞衰老时增生能力的下降可能是细胞衰老的基本过程之一。现在人们对衰老的机制做出了种种的推测,并进行了相应的研究实验,除了古老的遗传学说之外,还提出了端粒学说、自由基学说、突变学说、DNA 损伤修复学说等等。

组织和器官发生衰老时并无衰老细胞的特征性增龄变化。很难断定衰老的组织和器官中衰老细胞的作用。在这个水平上了解组成器官和组织的细胞之间在增龄过程中的相互作用更为重要。在细胞水平检测细胞器,找出引起其功能降低并导致死亡的变化,是核内还是细胞膜能标志出它是一个衰老细胞?所有细胞同时衰老吗?在分子水平研究增龄变化是为了观察最小的单位衰老时发生的变化,如分子的生物学功能。其研究范围从简单的带电离子到复杂的大分子如 DNA、RNA 或其他翻译产物。牙髓组织与其他的结缔组织一样也发生逐渐的增龄变化(age changes)。由于继发性牙本质的不断形成使得牙髓体积变小。血管和牙髓的细胞数量减少,胶原纤维数量增多。

一、细胞

比较 20 岁与 70 岁年龄的牙髓,牙髓中细胞数量下降近 50%。年轻的、有活力的牙髓细胞胞浆中含有丰富的粗面内质网、高尔基复合体和众多的线粒体。在增龄性变的牙髓细胞胞浆中,核周这些细胞器数量减少,体积变小,胞浆也减少,胞浆的突起变长、变细。这些变化可减弱牙髓对外界刺激的反应和自身愈合能力。

二、纤维

在增龄的牙髓中,胶原纤维呈束状或弥散性的聚集。纤维束多分布在根髓中,散在的纤维在冠髓中最突出。纤维的增多是逐渐的,增龄化的纤维增多表现在整个牙髓的纤维化,而龋病或其他刺激多引起牙髓局部的纤维增多。对于增龄后牙髓的纤维化,一些人认为是由于牙髓体积变小后使得纤维数量增多,另一种观点是牙髓组织对于胶原纤维的降解能力下降所致。

由于牙髓体积变小使得髓腔与牙冠表面的距离增大、部分牙本质小管矿化后阻塞以及神经的退变,使得牙髓对外界刺激的感受迟钝。

三、髓石和弥散性钙化

随着年龄的增长,牙髓中髓石和牙髓的弥散性钙化也增多。弥散性钙化主要出现在根

PDG

髓中，一般无临床症状。据认为髓石是以牙髓中血管或神经外周的胶原纤维鞘、钙化的血栓、钙化的坏死细胞为核，在此基础上形成的。

第五节　牙髓的基本功能

一、诱导作用(inductive)

牙髓除根尖孔与外界交通外，外周被坚硬的硬组织包围，但牙髓组织并不是孤立的。牙髓从其始基一出现，就与周围组织保持密切的联系。最早期的，参与形成牙乳头、牙髓的外胚间充质细胞诱导原口腔上皮基底层细胞分化为牙板并促使成釉器的形成。此后，牙乳头又进一步诱导成釉器的发育并最后形成特定部位、特定形状的牙齿。

二、形成作用(formative)和再分化(redifferentiation)

牙髓从牙乳头时期起即不断地形成牙本质，这主要是牙髓外周的成牙本质细胞可以产生牙本质的有机物并参与矿化。此外，成牙本质细胞在形成牙本质的过程中其自身也成为牙本质的一部分——牙本质小管内的成牙本质细胞突起。

在外界因素刺激下，相应部位的成牙本质细胞常发生变性，当刺激强度大、持续时间长时，变性的成牙本质细胞进一步坏死，在这种情况下，除了有未分化间充质细胞的分化外，相应部位的牙髓细胞经去分化后可分化为成牙本质细胞以替补坏死的成牙本质细胞。

牙髓组织是一种特殊的结缔组织，牙髓细胞是其中的成纤维细胞。目前认为，牙髓细胞的分化存在两种途径：一是牙髓细胞直接分化为成牙本质细胞；二是牙髓细胞首先经过去分化转变为幼稚的未分化间充质细胞样的细胞，然后受到诱导再进一步分化为成牙本质细胞。已有实验证实骨形成蛋白(BMP)可促进牙髓细胞的进一步分化。

三、营养作用(nutritive)

牙髓中丰富的血供不仅为牙髓本身提供充足的营养，并且还可为周围的牙本质提供营养物质。

四、保护作用(protective)

牙髓神经可感受施加于牙齿的冷、热、压力、制洞中的切割、电流以及化学物质的刺激，并将这些感觉均作为痛觉反映于中枢神经。此外，牙髓中的无髓交感神经通过控制和调节血管的舒张使牙髓可以对外界刺激作出反应。

五、防御(defensive)和修复(reparative)

牙髓有明显的修复再生能力。任何物理的或化学的刺激加到牙齿表面时，相应部位的牙髓组织对这些外界刺激可产生不同的反应。若受到的刺激是缓慢的、较弱的、持续的，牙髓可在相应部位的髓腔表面形成修复性牙本质。若受到的刺激强烈(如细菌本身或大量细菌产物侵入牙髓、牙本质切割和一些刺激性充填材料等)，则牙髓发生炎症反应，牙髓中的吞噬细胞、淋巴细胞、单核细胞、浆细胞以及从血管壁游出的中性粒细胞参与这种炎症反

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

应。此时，作为保护牙髓的坚硬的牙本质壁可以成为阻碍牙髓抵御外界刺激的因素。炎症的牙髓，由于渗出和水肿的持续，有可能出现脓肿或坏死。

在多数情况下，牙髓的本身状况良好，牙髓的修复和防御能力可以局限外界刺激造成的损伤并修复牙髓。

（一）牙髓组织对物理性刺激的反应

任何物理性刺激加到牙本质表面，相应部位的牙髓都会发生不同程度的反应。常见的有牙齿制洞时涡轮机对牙本质 - 牙髓复合体的刺激。经动物和临床观察发现，在与洞底相应的成牙本质细胞层排列紊乱，细胞空泡性变，有的泡相互融合形成大泡，使成牙本质细胞与前期牙本质分离；有时可见成牙本质细胞的胞核进入前期牙本质及矿化牙本质小管内形成所谓的杆状体。

在制洞 2～4 d 后，相应部位的牙髓和成牙本质细胞层见散在的炎细胞浸润，以中性粒细胞为主。制洞 2 周后牙髓开始修复，新分化和增生的成牙本质细胞修复变性、消失的细胞，修复性牙本质出现。一般在 10 周左右时，多数牙髓可恢复正常，达到完全修复。

（二）牙髓组织对化学性刺激的反应

化学性物质对牙髓的刺激常发生在制洞后由修复材料引起，如以三丁基硼或苯胺 - 过氧化物作催化剂的修复材料均对牙髓产生刺激，以后者的刺激更明显，表现为洞底部成牙本质细胞空泡性变，下方牙髓血管扩张充盈。当洞底较深时，修复 1 周后，部分成牙本质细胞消失，牙髓出现局灶性慢性炎细胞浸润。大多数牙髓在 2 周以后出现修复，成牙本质细胞层恢复并形成薄层修复性牙本质。

（三）牙髓对急性暴露（immediate pulp exposure）的反应

在牙齿受到创伤或由于治疗等机械性原因使牙髓暴露时，如果没有炎症刺激因素（如细菌、细菌毒素、口腔内各种残渣等）存在，牙髓发生急性反应。研究发现：在无菌情况下人的牙髓，在 2 周时开始有牙本质桥的形成。

牙髓暴露 2 d 时，暴露区表面血凝块形成，血凝块中含纤维素、血小板和大量红细胞。部分白细胞从血管内移出浸润入血凝块下重新组合的结缔组织中。在下方深部牙髓中，一些星形的成纤维细胞向血凝块方向、损伤的成牙本质细胞与前期牙本质之间伸出长长的突起。3 d 时，血凝块由于纤维素增加变得致密，邻近损伤区牙本质小管下方的成牙本质细胞完全退变，只残留细胞框架或残渣，有时邻近区域的成牙本质细胞也见空泡变性。血凝块下方的牙髓无明显的变性。

5 d 时，吞噬细胞将部分血凝块吸收、吞噬，部分成纤维细胞和未分化间充质细胞移行至暴露区附近，愈合区成纤维细胞和血管的数量都明显增多。6～7 d 以后，血凝块消失，牙髓表面出现成纤维细胞为主的细胞层。新的毛细血管长入使表面肉芽化。7～9 d 时，肉芽组织中的部分成纤维细胞和未分化间充质细胞开始转化和分化为前成牙本质细胞（preodontoblast）。12 d 时，成熟的成牙本质细胞形成并开始在牙髓表面产生及分泌前期牙本质的有机基质。随后，牙本质层增厚、融合并形成牙本质桥。

（四）牙髓对延时暴露（prolonged pulp exposure）的反应

由于龋病和一些医源性因素对牙本质 - 牙髓复合体的刺激，此时牙髓表现为一种延时的反应。对于炎症明显或已出现坏死的牙髓，以长杆形的 G^- 菌侵入为主；对于轻、中度炎症的牙髓，以 G^+ 球菌为主。牙髓在这种情况下多数已基本丧失了抵抗炎症和细菌继续侵

入的能力，临床治疗是缓解牙髓病理状况和临床症状的主要途径。但是，也有一些研究表明，直接暴露于口腔的牙髓即使受到污染，仍有较强的抵御炎症的能力，在暴露区下方可出现修复。因此，牙髓的防御和修复能力在不同的状况下表现也有所区别。

（五）牙本质桥的形成

对于暴露的牙髓，临床上常采用保守的治疗以缓解病人的疼痛和避免治疗失败。最常用的方法是去除牙髓，有时也采用盖髓术。盖髓术能达到的最理想的效果是在牙髓暴露区形成牙本质桥(dentin bridge)。如果盖髓材料中包含有生物陶瓷类材料(如羟基磷灰石、磷酸三钙等)、氢氧化钙或一些生长因子类成分(如 BMP，TGF－β 等)或其他一些非胶原性蛋白等，可提高牙本质桥的形成率。形成的牙本质桥与修复性牙本质相似，有不规则的牙本质小管和成牙本质细胞突起，可完全覆盖暴露的牙髓并将修复材料与牙髓分隔开来。

对于因外伤或龋病等原因导致牙本质全层缺损后，由牙髓自身的修复能力所产生的牙本质桥，在组织学上表现为最表层的坏死层，其中含有一些牙本质碎屑；中间层为骨样牙本质，基质中包埋有一些类似于骨或成骨细胞的立方状细胞，但无哈佛系统和骨小梁结构；深层为管状牙本质，基质内无细胞成分埋入，边缘有呈栅栏状排列的柱状成牙本质细胞。因此，可根据牙本质桥形成的组织变化将形成过程分为 4 个阶段：

1．渗出期(牙髓暴露 1～3 d 内)，表现为牙髓创面组织水肿、出血、炎细胞浸润以及不同程度的组织坏死。

2．增生期(第 3～7 d)，大量成纤维细胞、未分化间充质细胞移行至接近创面区并大量增生。

3．骨样牙本质形成期(第 6～14 d)，部分增生的细胞分化为成骨样细胞并产生骨样基质。

4．管状牙本质形成期(第 14～28 d)，在骨样牙本质形成的基础上形成牙本质，含有牙本质小管结构，所以称为管状牙本质，与牙髓交界处见成牙本质细胞。

对于牙髓暴露创面的牙本质碎屑的作用还不确定，有人认为残留的碎屑可起到盖髓剂作用促进牙本质桥形成，但也有人认为这些碎屑可导致继发感染或者成为牙本质瘤的中心，形成的牙本质桥不完整，主张尽量除去这些碎屑。

（金　岩）

第六节　牙髓干细胞

干细胞(stem cell)是指同时具有自我更新和产生分化细胞能力的细胞。根据其发育阶段不同，干细胞又可分为胚胎干细胞(embryonic stem cell)和成体干细胞(aduet stem cell)。胚胎干细胞是最早期的未分化细胞，可分化成各种组织细胞，形成各种器官，也称为“全能干细胞”。在发育过程中，全能干细胞逐渐分化，形成“多能干细胞”，又称组织干细胞，是一种或几种组织的起源细胞，在成人的组织中含量极少但却发挥重要功能，如皮肤干细胞、神经干细胞、造血干细胞、胰岛干细胞、牙髓干细胞等。随着近年来“干细胞生物工程”的蓬勃展开，目前利用牙髓干细胞生成组织工程化牙本质－牙髓复合体以实现牙髓再生已成为牙髓生物学研究和牙髓病的生物治疗领域中的热点课题。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

一、牙髓干细胞的生物学特征

Gronthos S、Maneani M、Brahin J 等(2000)报道从人的第三磨牙牙髓组织中通过体外培养,获得集落状生长的、体外可诱导分化形成牙本质样结构的成牙本质细胞的前体细胞,并具有增殖分化的干细胞特性,从而首次提出了牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)的概念。

牙髓干细胞属于组织干细胞,其特点是自我更新和多向分化潜能,这也是不同的组织干细胞的共性。

(一)增殖特征

牙髓干细胞具有不对称分裂的特点,不对称分裂即 A→A + B 的分裂方式,是指一个子代细胞 A 是和母代干细胞完全相同的细胞,也具有多向分化潜能特性,可分化成牙髓组织不同类型的细胞。另外一个子代细胞 B 可能因为启动了分化特异的基因,成为一个具有一定分化方向的牙髓前体细胞。牙髓前体细胞并非终末分化细胞,它仍然保持部分干细胞的特性,如可以自身复制,也可以进行不对称分裂等等,这种细胞进一步的不对称分裂就可产生一个分化上相对更加成熟的牙髓前体细胞。如此经过多代的分裂和复制,最终产生终末分化细胞。此外牙髓干细胞还可进行对称的分裂即 A→A + A,产生与它自身完全相同的两个干细胞。在体外培养时,牙髓干细胞可增殖分裂,形成克隆状的细胞,这些干细胞团实际上由干细胞和前体细胞组成。将细胞克隆消化后制成单细胞悬液,其中的干细胞可以继续形成新的干细胞团;而其中的前体细胞,当供给适合的培养条件时便开始朝一定方向分化,最终形成终末分化的细胞。

(二)多向分化特征

牙髓干细胞作为成牙本质细胞的前体细胞,其主要功能与成牙本质细胞的分化、修复性牙本质形成和矿化密切相关。将牙髓干细胞在含有 L-抗坏血酸、β-甘油磷酸盐等矿化诱导液培养基中培养 5~6 周后,经 Alizarin red 染色表明有钙结节形成。利用电子显微镜观察到牙髓干细胞可以形成与前期牙本质相似的球状矿化基质,说明牙髓干细胞在一定条件下可向成牙本质细胞分化。郭红延、吴补领、郭希民等(2004)采用细胞克隆分离培养的方式,从大鼠牙髓细胞中成功地筛选出大鼠牙髓干细胞 2B2 株,并对其形态学、生长及增殖、矿化能力、细胞克隆形成等一系列细胞生物学特征进行了研究。发现大鼠牙髓干细胞 2B2 株为成纤维细胞样生长,生长能力弱于大鼠骨髓间充质干细胞,其克隆形成率为 2.55%。经一定的诱导后出现矿化结节,表明具有一定的矿化能力,在 TGF-β 的诱导下可表达 DSPP,提示大鼠牙髓干细胞可向成牙本质细胞分化。

在体实验将牙髓干细胞接种到羟磷灰石和磷酸钙中,再将该复合物移植到免疫耐受小鼠背侧皮肤下,结果在移植处有牙本质-牙髓样结构形成。在该结构中,胶原纤维垂直穿过矿化结节的表面,和正常牙本质结构相似。该结构还富含牙本质特异性蛋白(牙本质涎磷蛋白,DSPP),类牙本质结构被成牙本质细胞样细胞包绕,这些细胞伸出很长的胞突深入到矿化基质中,矿化基质周围形成类似活髓中的血管和结缔组织。

除向成牙本质细胞分化外,牙髓干细胞还具有横向分化的潜能。脂肪诱导培养基(异丁甲基黄嘌呤、皮质醇、吲哚美辛等)能够诱导牙髓干细胞表达上调脂肪细胞的特异性标志(脂蛋白酶和过氧化物酶生长活性受体,PPARγ2)。同时研究表明:牙髓干细胞能够表达神

经前体细胞和神经胶质细胞的标志 nestin 和胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acid protein, GFAP),说明牙髓干细胞具有向神经细胞分化的潜能。

二、牙髓干细胞的细胞表型和鉴定

研究和确认干细胞表面的分子标记是分离鉴定和研究干细胞功能的重要手段。学者们对原代培养的牙髓干细胞和骨髓基质干细胞的表面标志进行了比较,发现二者的抗原表型不是单一的,而是兼有间充质、内皮和肌肉细胞的特征,表达包括细胞外基质成分、细胞黏附分子、成骨特异性调节的转录因子和骨相关的标志分子、调节牙本质和骨形成的生长和分化因子等,其中有超过 4 000 个基因的表达水平是一致的。但牙髓干细胞和骨髓基质干细胞的表面标志也存在差异,如 18 型 α - 1 胶原、胰岛素样生长因子 2、酪氨酸激酶、NAD(P) - 氧化还原酶、细胞周期依赖性蛋白激酶(CDK6)在牙髓干细胞中高表达,而胰岛素样生长因子连接蛋白 7(IGFBP)和 I 型 α - 2 胶原则在骨髓基质干细胞中高表达。

目前对牙髓干细胞的鉴定还没有明确的特异性标志,根据近年的研究结果,牙髓干细胞应具备以下特征:来源于牙髓组织,具有干细胞的自我增殖特征;表达干细胞标志 STRO - 1和 MUC - 18;尚未分化,不表达牙本质特异性基质蛋白(DSPP);具有体内外扩增分化为成牙本质细胞并形成牙本质的功能;在矿化液诱导下可生成钙化结节;具有形成脂肪细胞和神经细胞等多向分化的潜能。

三、牙髓干细胞的来源和分布

牙髓干细胞存在于牙髓组织中,有学者认为它可能来源于外胚间充质。在胚胎发育过程中,颅神经嵴向腹外侧迁移到达颌突的中胚层后就被称为"外胚间充质"。神经嵴源性外胚间充质干细胞具有可塑性,可分化为骨、软骨、牙本质和牙髓等多种组织,在颅面和牙齿发育中起重要作用。张光东、金岩、史俊南等(2003)采用碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和胰岛素样生长因子 1(insulin - like growth factor 1, IGF - 1)诱导大鼠外胚间充质干细胞,结果细胞出现单极胞浆突起,平行排列,且表达 DSP,矿化液培养 21d 后,细胞形成矿化结节,证实外胚间充质干细胞可在 bFGF 和 IGF - 1 的诱导下向成牙本质细胞样细胞分化。邓蔓菁、金岩、史俊南等(2003),周泽渊、金岩、史俊南等(2004)对外胚间充质干细胞的多向分化和可塑性进行了研究,证实其可向平滑肌细胞、成骨细胞、成牙本质细胞分化。

而 Shi S、Gronthos S(2003)研究发现:牙髓干细胞与骨髓干细胞一样,均存在于来源组织小血管附近的"龛"中,并表达血管内皮细胞周细胞特异性标志 CD146 和 3G5,提示牙髓干细胞也可能来源于发育中的血管组织。

在成体牙髓组织中,Gronthos S、Manhani M、Brahim J(2000)认为牙髓干细胞由不同分化层次的细胞组成,其存在数量多少与机体年龄大小有关,年龄较小、牙齿发育未完成的年轻恒牙牙髓中更容易找到干细胞,而年龄较大的成熟恒牙则可能较少。

Masako(2003)在人脱落的乳牙残留牙髓中也发现了具有多种分化潜能的干细胞,并称之为 SHED (stem cells from human exfoliated deciduous teeth)。SHED 被认为是一种高度增殖的细胞并形成细胞克隆,且能分化成多种不同的细胞类型,如神经细胞、脂肪细胞、成牙本质细胞,体内移植后,SHED 能够诱导骨组织形成,诱导牙本质形成,可以在小鼠的大脑中存

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

活并表达神经标记物。与恒牙的牙髓干细胞相比，SHED存活时间更长，体外培养时生长更为迅速。SHED的发现为人们提供了一种更为方便的获得干细胞的途径。

四、影响牙髓干细胞增殖和分化的因素

干细胞的增殖分化在多种因素的调控下有序地进行。转录因子在干细胞的分化调控中发挥着极为关键的作用。尤其是位于分化途径上游的转录因子，其表达与活性常是某种组织分化的必要和充分条件。另一方面，细胞的分化方向还受到细胞外因素的调控。这些因素一类是可扩散的细胞信号分子如细胞因子，另一类则是相邻细胞间的相互作用，如Notch信号途径。

有研究表明Notch－RBP－f信号途径对成年个体的干细胞分化方向具有调节作用，在神经干细胞中激活Notch信号途径可诱导神经干细胞向胶质细胞的方向分化，在造血干细胞中激活Notch信号途径可促进干细胞的自我更新。陆群等通过RT－PCR方法，从牙髓干细胞中检测到Notch的存在，说明Notch信号途径在牙髓干细胞的分化中也发挥着重要作用。

Liu H、Li W、Gao C，等(2004)研究了TGF－β与牙髓干细胞增殖和分化的关系，发现当细胞出现分化时，Cbfa1和胶原的表达上调，内源性TGF－β及其信号分子的表达也明显上调。当加入外源性的TGF－β后，骨形成相关基因的表达明显受到影响，表现为二聚糖的表达提高，而核心蛋白多糖的表达降低，胶原合成增加。但外源性TGF－β会明显抑制牙髓干细胞的增殖，提示可能与其促进细胞分化的功能有关，TGF－β通过调节蛋白多糖和胶原合成相关基因的表达来促进细胞的分化。

最近又有研究发现：细胞外基质磷酸化糖蛋白的一个含23个氨基酸的片断(Dentonin)能促进牙髓干细胞的增殖，它是通过上调P16和泛素蛋白酶E3A和人泛素相关蛋白SUMO－1来实现的，但Dentonin中必须含有完整的RGD和SGDG序列才能促进细胞增殖。

五、牙髓干细胞的应用前景

牙髓干细胞的研究有着广阔的应用前景。牙髓干细胞可作为靶细胞，将促进牙髓组织再生和修复性牙本质形成的因子导入进行基因治疗，这将对保存活髓，诱导牙髓再生具有重要意义。还可将牙髓干细胞作为种子细胞，接种到适宜的有生物活性的支架材料上，实现牙本质－牙髓复合体的组织工程化，为进一步的牙齿再生奠定基础。目前已有利用外胚间充质细胞构建组织工程化牙本质－牙髓复合体的研究，包柳郁、金岩、史俊南等(2004)将经bFGF和IGF－1或TGF－β诱导的牙源性间充质细胞接种于复合同种生长因子的陶瓷化骨和collagraft复合材料上，将细胞－支架复合物移植到免疫缺陷小鼠的皮下，结果形成了较典型的牙本质－牙髓复合体样结构。可以预见，牙髓干细胞作为首选的种子细胞和可靠的细胞来源，必将在牙髓病的生物治疗和牙齿组织工程领域中发挥重要作用。

（王　英）

参考文献

1. 高志荣、肖明振、史俊南等．牙髓、牙周微血管分布的实验观察．中华口腔科杂志．1985;20(5):259
2. 崔辉庭、张北、屈辉等．正常青年人牙髓、牙周、下颌骨微血管造影实验研究．中华口腔科杂志．

1986;21(3):168

3. Bhaskar SN. Development And Growth Of Teeth. In: Orban's Oral Histology And Embryology. 10 th Edi, The C. V. Mosby Company. 1986;24
4. 陆先锟. 主编. 口腔组织病理学. 第 2 版. 西安:第四军医大学. 1987
5. Avery JK. Development Of Teeth. In. Oral Development And Histology. Williams Wilkins. 1987;80
6. 李辉奉、马兵、李祖兵等. 墨汁灌注法对 20 颗狗牙正常牙髓血管的形态学研究. 临床口腔医学杂志. 1989;5(4):193
7. Walton RE, Torabinejad M. Biology Of Tthe Pulp And Periapical Tissues. In. Principles And Practice Of Endodontics. W. B. Saunders Company. 1989;7
8. 潘苏、史俊南、高志荣. 牙髓形成过程中微血管分布的免疫组化研究. 实用口腔医学杂志, 1990;6(增刊):216
9. 金岩. 牙齿与骨形成蛋白(BMP)的关系. 国外医学口腔分册. 1992;19:342
10. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis Critical Reviews in Oral Biology and Medicine. 1993;4:679
11. Thesleff I, Vaahtokari A, Kettunen P, et al. Epithelial – mesenchymal signaling during tooth development. Connect Tissue Res. 1995;32(1 – 4):9
12. 张举之,樊明文. 主编. 口腔内科学. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社. 1995
13. 樊明文. 主编. 口腔生物学. 北京:人民卫生出版社,1996
14. Thesleff I, Vaahokari A, Vainio S, et al. Molecular mechanisms of cell and tissue interactions during early tooth development, Anat Rec. 1996;245(2):151
15. Wolpert L. Principles Of Development. 1st ed. London And Oxford: Current Biology Ltd and Oxford University Press. 1998
16. Ten Cate AR. Oral Histology: Development, Structure, And Function. 5th ed St. Louis: Mosby – Year Book Inc. 1998
17. Helder M, Karg H, Bervoets TJ, et al. Bone morphogenetic Protein – 7 and tooth development. J Dent Res. 1998;77(4):545
18. Helder M, Karg H, Bervoets TJ, et al. Bone morphogenetic protein – 7 and tooth development. J Dent Res. 1998;77(4):545
19. Zhang Y, Zhao X, Hu Y. Msx1 is required for the induction of patched by sonic hedgehog in the mammalian tooth germ. Dev Dyn. 1999;215(1):45
20. Peters H, Balling R. Teeth. Where and how to make them. Trends Genet. 1999;15(2):59
21. 于世凤. 主编. 口腔组织病理学. 第 4 版. 北京:人民卫生出版社. 2000
22. 史俊南 主编. 现代口腔内科学. 北京:高等教育出版社,2000
23. Gronthos S, Mankani M, Brahim J. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Dec 5;97(25):13625
24. Gronthos S, Brahim J, Li W. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J Dent Res. 2002 Aug;81(8):531
25. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. J Bone Miner Res. 2003 Apr;18(4):696
26. Miura M, Gronthos S, Zhao M. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. PNAS, May 13, 2003; 100(10): 5807
27. Batouli S, Miura M, Brahim J, et al. Comparison of Stem – cell – mediated Osteogenesis and Dentinogenesis. J Dent Res. 2003 Dec;82(12):976
28. 张光东、金岩、史俊南等. 胰岛素样生长因子 1 诱导外胚间充质干细胞向成牙本质细胞样细胞分

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

化. 牙体牙髓牙周病学杂志. 2003;13(2):66

29. 邓蔓菁、金岩、史俊南等. Balb/c 胎鼠下颌突外胚间充质细胞向成骨细胞诱导分化的体外研究. 牙体牙髓牙周病学杂志. 2003;13(5):237
30. Liu H, Li W, Gao C, Kumagai Y. Dentonin, a fragment of MEPE, enhanced dental pulp stem cell proliferation. J Dent Res. 2004 Jun;83(6):496
31. Lu Q, Wu BL, Wang JS. Characterization of Notch gene involved in genetic regulatory networks in dental pulp stem cells. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 2004 Feb;22(1):54
32. 郭红延、吴补领、郭希民等. 大鼠牙髓干细胞的培养和鉴定. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2004;14(5):339
33. 周泽渊、金岩、史俊南等. 大鼠外胚间充质干细胞的形态学研究. 牙体牙髓牙周病学杂志. 2004;14(5):179
34. 包柳郁、金岩、史俊南等. 人牙源性间充质细胞与陶瓷化骨支架材料相容性的实验研究. 中国临床康复杂志. 2004;8(7):1458

第四章　成牙本质细胞分化和牙本质形成

过去几十年中，关于成牙本质细胞分化和牙本质形成机制的研究，越来越受到学者们的重视。由于基底膜的细胞外基质介导的上皮与间充质相互作用，启动了原始牙本质的形成，有关这方面的报道很多。但是，在缺少外胚层和基底膜的牙髓组织中，牙本质形成仍然可以启动，这是牙本质修复过程的重要部分。牙本质形成的再次启动需要新一代的成牙本质细胞，控制成牙本质细胞再次分化的机制目前还不清楚。本章主要讨论原始成牙本质细胞、成牙本质细胞样细胞的分化以及牙本质形成的再次启动机制和假说。

第一节　成牙本质细胞的表型

成牙本质细胞的特征非常明显，它们与牙乳头细胞（牙髓细胞）和上皮细胞明显不同。而唯一具有形成牙本质能力的外胚间充质细胞（ectomesenchyme），则来源于神经嵴。

一、成牙本质细胞的分化特征

成牙本质细胞分化是从牙尖处开始，逐渐向根方发展。一个成牙本质细胞分化持续数小时，秋水仙素和细胞松弛素 B 可干扰其终末分化。成牙本质细胞的分化有如下特征：

（一）细胞分裂终止：前成牙本质细胞（preodontoblasts）完成最后一次有丝分裂后，脱离细胞周期（cell cycle），除某些实验条件下，成牙本质细胞一般不具有进一步分裂的能力。

（二）细胞极化：与基底膜接触的子代细胞（daughter cell）沿基底膜排列，体积增大，胞体伸长，胞核偏极，胞浆突起形成成牙本质细胞突。粗面内质网的排列与细胞长轴一致，数个高尔基体组成的高尔基区扩大，这一现象被认为是成牙本质细胞分化的第一特征，细胞浆膜的改造和细胞骨架的重排则是成牙本质细胞极化的特征。

（三）分泌前期牙本质基质：成牙本质细胞分泌部位有两个，一个位于胞浆突基部，另一个位于胞浆突远端。未分化的牙乳头细胞和未成熟的前成牙本质细胞主要合成Ⅰ型和Ⅲ型胶原。在成牙本质细胞极化的过程中，位于间充质面的基底膜的胶原成分不断改建，Ⅰ型胶原合成增多，而代表牙髓活力的Ⅲ型胶原的合成受到抑制。分化良好的成牙本质细胞亦合成Ⅴ型和Ⅵ型胶原。

成牙本质细胞分化过程中及其完成后的其他变化有：

1. 氨基多糖的沉积。
2. 纤维黏连蛋白（fibronectin，Fn）合成抑制，细胞黏合素（tenascin）和多配体（蛋白）聚糖（syndecan）等细胞外基质成分消失。
3. 合成其他的非胶原蛋白，如骨钙素、骨黏合素、涎蛋白和生长因子等。

二、成牙本质细胞的表型

分化成熟的成牙本质细胞可合成和分泌牙本质基质中的胶原蛋白和非胶原蛋白（non

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

- collagenous proteins, NCPs)。胶原蛋白主要构成牙本质基质的支架,非胶原蛋白在牙本质基质矿化过程中起重要调节作用。其中牙本质磷蛋白(dentin phosphophoryn, DPP)、牙本质涎蛋白(dentin sialoprotein, DSP)和牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein, DSPP)曾被认为属于牙本质特异性非胶原蛋白。

近年来,国内外学者对牙本质非胶原蛋白进行了大量的研究,取得了较大的进展。DSP是Butler(1987)从大鼠牙本质基质提取物中发现的一种特殊的酸性糖蛋白,它占牙本质基质非胶原蛋白总量的5% ~ 8%,富含天冬氨酸(asparatate)、丝氨酸(serine)、谷氨酸(glutamate)和甘氨酸(glycocine)。因与骨涎蛋白(bone sialoprotein, BSP)在组成和结构上相似而得名。Ritchie HH, Berry JE, Somermant MJ等(1994)首先克隆了大鼠DSP cDNA序列,共编码383个氨基酸,其中包括17个氨基酸残基组成的信号肽和366个氨基酸残基组成的分泌蛋白,该蛋白含有6个潜在的N-连接糖基化位点和13个潜在的磷酸化位点。DSP在牙本质形成中的确切功能尚不清楚,推测很可能参与了羟基磷灰石晶体的形成,或像其他一些基质蛋白,如Fn、细胞黏合素一样充当信号转导分子。Ritchie HH, Berry JE, Somermant MJ等(1997)提出如下假说:前成釉细胞分泌的信号分子激活前成釉细胞表达DSP,由其分泌的DSP分子再传导至毗邻的成牙本质细胞,触发成牙本质细胞活化。张莹、史俊南、顾淑萍(2002)采用RT-PCR方法从人牙乳头组织中扩增出人DSP的cDNA片段,高效表达后获得多克隆抗血清,检测了人不同组织以及在人牙胚发育过程中DSP的表达,结果表明DSP主要在成牙本质细胞中表达,可直接通过成牙本质细胞突起穿过前期牙本质分泌至矿化前沿,参与牙本质的形成。另外,DSP在前成釉细胞和成釉细胞中的一过性表达,提示DSP还可能参与了上皮与间充质之间的信号传递。

DPP是牙本质中含量最多的非胶原性糖蛋白,占非胶原蛋白总量的50%,其显著特点是高度磷酸化,为目前已知的酸性最强的蛋白质之一。由于它在组成上的单一性,加之属于不稳定的高磷酸化蛋白,一直很难用常规氨基酸测序或肽分离技术测定其一级结构。直到1998年,Gu K, Chang S, Ritchie HH等利用RT-PCR技术从人未成熟磨牙牙根的总RNA中克隆到DPP的cDNA,人们对DPP的DNA序列和氨基酸组成才有了一个较为明确的认识。DPP的cDNA包括一个由2364bp组成的开放阅读框,共编码788个氨基酸,它富含丝氨酸(S,58.6%)和天冬氨酸(D,26%),这些氨基酸残基组成了(DSS)n,n = 1 ~ 16,DS和NSS(N为天冬酰胺,asparagine)的重复序列区,其中的丝氨酸残基有53%可以被酪蛋白激酶Ⅰ或Ⅱ磷酸化,因此形成了DPP高度磷酸化的特点。DPP参与了牙本质矿化的启动和调节,由成牙本质细胞合成后释放到牙本质矿化前沿,一方面,它可与胶原纤维紧密结合;另一方面,它和钙离子有高的亲和力,可富集钙离子,从而启动羟基磷灰石晶体的形成。DPP在牙齿发育中表达及其调控的研究表明:DPP在分化成熟的成牙本质细胞中持续表达,并且在成釉细胞和前成釉细胞中表达。TGF-β1对DPP的调控比较复杂,内源性TGF-β1和DPP在成牙本质细胞中的表达具有一致性,而外源性TGF-β1下调成牙本质细胞DPP的表达。

长期以来由于DSP、DPP在氨基酸组成以及在牙本质中的含量等方面均有很大差异,DSP、DPP一直是作为独立的基因在进行研究。直到MacDougall M, Simmons D, Luan X等(1997)克隆了小鼠DSPP cDNA,证实DSP、DPP来自于一个共同的编码基因牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein, DSPP),它们是一个转录本(DSPP mRNA)的表达产物的不同切割片断,从而产生了理化性质不同的两种蛋白。Gu K, Chang S, Ritchie HH等(2000)在人类

PDG

基因组中证实了 DSPP 基因的存在。人 DSPP 基因由 5 个外显子和 4 个内含子组成，包括 1 个 3759bp 的开放阅读框，编码 1253 个氨基酸残基，外显子 1～4 编码 DSP，而外显子 5 除编码 DSP 的 C 末端外，还编码全部的 DPP。原位杂交实验表明：DSPP 基因主要由正在极化和成熟的成牙本质细胞表达，并在前成釉细胞中具有一过性表达。采用 DSPP 反义核酸对体外培养牙胚发育和矿化影响的研究表明：DSPP 反义核酸不仅可抑制牙胚的矿化，还可减缓体外培养牙胚的发育。因此，DSPP 在牙本质矿化中起重要作用。大量研究证实：DSPP 基因突变可以导致牙本质发育不全，目前已先后在 5 个牙本质发育不全Ⅱ型家系中发现了 5 个不同的突变。突变部位均集中在 DSP 编码区域，有的仅改变了 DSP 蛋白质的一级结构，而有的则导致了蛋白质合成的中断，这一事实更有力地说明了 DSP、DPP 在牙本质形成和矿化中发挥着至关重要的作用。

以前的研究大多认为 DSPP 是成牙本质细胞特异性蛋白，主要在成牙本质细胞、前期牙本质和牙本质小管中表达，在前成釉细胞和成釉细胞中具有一过性表达，因此多以 DSPP 作为成牙本质细胞分化的特异标志。但近期越来越多的研究表明：DSPP 具有更广泛的组织表达。张蓉、肖明振、赵守亮等(2001)发现 DSPP 除牙齿外，还在小鼠鼻软骨中表达，采用 RT－PCR 法从小鼠鼻软骨中克隆到 719bp 的 DSPP cDNA 序列，提示 DSPP 有可能不是牙本质特异性蛋白。Qin C，Brunn JC，Cadena E 等(2003)采用 Western blot 方法在大鼠长骨的提取物中检测到了 DSP 的存在，并通过 RT－PCR 法在 MC3T3－E1 细胞、成骨样细胞 ROS 17/2.8和小鼠颅骨中扩增获得了 DSPP cDNA 序列，证实 DSPP 在成骨细胞和骨组织中亦有表达，但表达量极低，仅为牙本质的 1/400。Baba O，Qin C，Brunn JC 等(2004)采用抗 DSP 的多克隆抗体和单克隆抗体对处于牙根发育期的大鼠第一磨牙进行免疫组化研究，结果在牙槽骨、细胞性牙骨质、成骨细胞、成牙骨质细胞以及细胞间质中均发现了 DSP 的表达，提示 DSP 还可能与牙周组织的形成有关。由于尚未发现更具特异性的标志物，因此目前仍以 DSPP 作为成牙本质细胞分化的重要标志。

牙乳头未分化间充质细胞具有分化为成牙本质细胞的能力，并且这一特殊的能力是发育中牙齿形态发生所必需，间充质的其他细胞不能分化成具有形成牙本质能力的细胞。在牙齿形成的起始阶段，口腔上皮和相邻的间充质之间的相互作用可能赋予牙乳头细胞分化为成牙本质细胞的能力。早期胚胎发育阶段牙乳头具有的分化能力在成熟的牙髓组织中仍然保留。在牙髓修复过程中，生理、细菌或化学刺激作用于牙本质表面（导致原始成牙本质细胞坏死），切髓或盖髓处理暴露的非慢性炎症的牙髓，这些因素都会导致一层体积增大的极化细胞的出现，并形成管状的牙本质基质，但还不知道这些细胞是否具有与原始成牙本质细胞相同的特异表型。通过对盖髓、牙胚移植、牙本质或异源性 Fn 植入后的观察，发现新形成的成牙本质细胞的超微结构与原始的细胞一致。但有学者的研究结果，表明两者在生物合成能力方面存在着差异。

由于学者们未对分化的成牙本质细胞样细胞做出明确的定义，那些合成前期牙本质样基质而没有极化的细胞仍被认定为新成牙本质细胞。目前仅有成牙本质细胞重要的生化标志可以提供较为明确的信息。人们已经尝试使用抗骨钙素抗体抗各种细胞（如牙髓细胞、间充质细胞和正在分化的原始成牙本质细胞）的细胞膜的单克隆抗体来阐明继发的成牙本质细胞的表型特征。Veis 报道牙髓细胞之所以有分化能力与其能够合成 DPP 有关，因为只有完全表达成牙本质细胞表型才能分泌这些牙本质非胶原蛋白，新成牙本质细胞分泌

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

的基质与 DPP 抗体反应也可以识别其具有成牙本质细胞的特性。

第二节　发育中成牙本质细胞的分化

在正常发育过程中，成牙本质细胞表型的表达必须同时具备两个条件：细胞需经过最少次数的细胞周期和基底膜细胞外基质施加的特异的渐成信号(epigenetic signal)。

在牙胚的帽状期和钟状早期，要区分正在分化的成牙本质细胞和牙乳头细胞是很困难的。两个方面可以提示细胞分化：

1. 有丝分裂能力的差别：正在分化的前成牙本质细胞的细胞周期进行性增加。

2. 分裂细胞的定向：前成牙本质细胞纺锤体的排列与基底膜垂直。正在分化的细胞经过最后一次分裂后一分为二，靠近基底膜的细胞成为成牙本质细胞，而远离基底膜的 Holl 细胞则组成有替代成牙本质细胞潜力的细胞层，Holl 细胞是否也为后有丝分裂细胞(post - mitotic cell)还不清楚。

牙乳头细胞经过最少次数的细胞周期后，原始的成牙本质细胞发生分化。此后即使在特异诱导因素的作用下，牙乳头细胞也不会再分化为新成牙本质细胞。

一、细胞与基质的相互作用

位于上皮和间充质之间的基底膜细胞外基质触发了成牙本质细胞终末分化的发生。已经过最后一次有丝分裂的前成牙本质细胞与基底膜接触，才能成为分化完全的细胞，基底膜的重建是前成牙本质细胞分化的前提。人们推测成牙本质细胞的极化和前期牙本质的分泌离不开基底膜基质的成分和特殊结构的作用。

电镜下基底膜由三层结构组成：电子致密的基板（也称致密板，lamina densa）、透明板(lamina lucida)、扩散板(lamina diffusa)。在牙板开始形成时，扩散板非常稀疏，随后出现较多的纤维和颗粒状物质。基底膜由Ⅳ型纤维网组成，含有丰富的细胞外基质。基底膜成分既有上皮来源又有间充质细胞来源。基底膜的细胞外基质包括 Fn，层黏连蛋白(laminin)，I 型和Ⅲ型胶原，蛋白多糖如硫酸肝素、硫酸软骨素、透明质酸等。基底膜上的细胞外基质与前成牙本质细胞表面的受体结合，基底膜成分作为一种信号分子控制前成牙本质细胞的分化。

基底膜随成牙本质细胞的分化而发生变化，如Ⅲ型胶原在终末分化过程中逐渐消失，而 tenascin 和上皮来源的釉原蛋白(amelogenin)在分化过程中逐渐增加。基底膜开始出现小孔，逐渐变为不连续状，最终完全消失。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteins，MMP)可能参与基底膜的降解。林媛(2001)、金涛等(2002)的研究表明：釉质溶解素(enamelysin，MMP - 20)及其特异性组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases，TIMPs)在大鼠牙胚发育过程中的表达具有时间特异性和细胞特异性，它们协同作用，参与牙齿硬组织的形成。而 MMP - 2 在大鼠和人牙胚发育过程中通过参与基底膜降解而参与牙齿形态的形成。

内釉上皮控制成牙本质细胞分化的作用是通过基底膜来进行的。从牙板形成阶段到成牙本质细胞终末分化起始阶段，内釉上皮和牙乳头之间存在着一层连续的基底膜。Meyer JM，Ruch JV，Kubler MD 等(1995)发现：基底膜本身在成牙本质细胞分化过程中并未起关键作用，重要的是内釉上皮。内釉上皮细胞分泌一些能扩散的生物分子如多种生长因子和

蛋白多糖等，这些分子通过基底膜并活化，到达前成牙本质细胞并与细胞表面受体结合而诱导成牙本质细胞的分化。

分化过程中最有代表性的变化是 Fn 不断沉积在极化细胞顶端的周围。Fn 是一组大分子糖蛋白，许多类型的细胞均可合成，大量出现在细胞浆中。它们可以启动细胞与细胞、细胞与基质的黏连，在发育、伤口愈合中发挥重要的作用。Fn 还能与各型胶原、蛋白多糖、其他糖蛋白甚至非晶体结构结合。有研究发现：在牙胚发育过程中，成牙本质细胞尚未分化时，Fn 强染于牙尖发生处的细胞聚集区。当出现成牙本质细胞分化和牙本质形成时，Fn 强染于前期牙本质与成牙本质细胞界面、成牙本质细胞突起、细胞顶端胞浆、细胞之间连接处，尤为明显的是在牙乳头间充质细胞向成牙本质细胞分化时，内釉基质膜为强阳性，与之相邻近的聚集的间充质细胞也有较多分布，在细胞极化的晚期，Fn 逐渐消失。

细胞外基质成分与分化中细胞膜特异位点间生物力学的结合在调控原始成牙本质细胞分化中起着举足轻重的作用。具体地说，通过 Fn 前成牙本质细胞黏附于基底膜，这为原始牙本质的组织发生创造了前提条件。Fn 受体（165kD）参与 Fn 介导的细胞与基质黏附过程的起始阶段。Fn 及其受体在牙髓细胞中均有表达，并且在静止的前成牙本质细胞中重新结合，调节着细胞骨架的状态，导致细胞极化。抗 Fn 及其受体的单克隆抗体可以阻止体外牙胚中成牙本质细胞的极化，这一实验证实了 Fn 与细胞膜的相互作用在成牙本质细胞分化中的重要意义。

二、成牙本质细胞分化与生长因子、激素

许多生长因子可能参与成牙本质细胞的分化，目前发现的有表皮生长因子（EGF）、成纤维细胞生长因子（FGF）、胰岛素样生长因子（IGF）、神经生长因子（NGF）、转化生长因子（TGF）超家族，其中对 TGF 和 FGF 超家族作用的研究较深入。

TGF－β 最先被学者们从人血小板、胎盘中分离出来，两年以后这种分子被克隆。目前 TGF－β 家族主要成员有 TGF－β1、β2、β3 和骨形成蛋白（BMPs），它们对细胞的生长、分化和细胞外基质的形成具有调节作用。

D'Souza RN，Happonen RP，Ritter NM 等（1990）采用免疫组化手段研究了大鼠磨牙牙胚中 TGF－β1 的分布，发现钟状期牙胚的星网状层、牙乳头间充质细胞、成牙本质细胞呈阳性染色，认为 TGF－β 在牙本质形成早期调节细胞增殖，而后期调节细胞分化。原位杂交发现：牙胚中的成牙本质细胞表达 TGF－β1 和 β3，体外培养的成牙本质样细胞也有 TGF－β1 和 β3 的表达。Jepsen S，Schiltz P，Strong DO 等（1989）采用原位杂交检测了羊新生磨牙中 TGF－β1 的表达，结果发现内釉上皮、成熟的成牙本质细胞和成釉细胞呈阳性，说明 TGF－β 对成牙本质细胞的分化有重要作用。体外培养含有前成牙本质细胞的牙乳头组织在肝素或 Fn 存在时，TGF－β 可诱导细胞极化，发生成牙本质细胞样功能分化。若用抗 TGF－β 的单克隆抗体预先阻断，使 TGF－β 失去活性，则这种诱导作用消失，表明 TGF－β 可诱导成牙本质细胞分化。

Begue－Kirn C，Smith AJ，Ruch JV 等（1992，1994，1998）利用牙胚体外培养观察了 TGF－β1、BMP－2、IGF 对牙乳头细胞分化的诱导作用，结果发现 TGF－β1 加肝素能成功诱导前成牙本质细胞的分化。同时采用原位杂交比较了 TGF－β1、BMPs、IGF、Msx、Fn 和骨涎蛋白在体外培养的成牙本质细胞与胚胎期成牙本质细胞内的基因表达特征，结果发现上述基因

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

的表达在体外诱导分化和体内生理性分化过程中非常相似。分化成熟的成牙本质细胞的细胞学形态和功能特征几乎和体内生理条件下成牙本质细胞相同，转录 DSP 和 DPP，并且分泌前期牙本质基质。这些实验结果均表明 TGF－β 具有诱导细胞分化和促进细胞外基质分泌的作用。

张莹（1999）、苏凌云（1999）发现 TGF－β 可促进体外培养的人牙乳头间充质细胞增殖，影响其碱性磷酸酶活性。TGF－β 受体在小鼠、人牙胚发育过程中呈动态变化，表明 TGF－β 参与牙胚发育存在着受体水平的调节。体外培养的人牙乳头间充质细胞中，TGF－β Ⅰ型、Ⅱ型受体呈强阳性表达，Ⅲ型受体呈阳性表达，外源性 TGF－β 不影响其受体表达水平，提示 TGF－β 可能通过自分泌和（或）旁分泌方式与人牙乳头细胞表面的受体结合，参与成牙本质细胞的分化、成熟。

细胞因子需通过细胞内信号分子转导至核内，调控目的基因的表达，从而实现其生理和病理学功能。Smad 分子是近年发现的 TGF－β 的细胞内信号分子，目前已形成一个家族，包括 9 个成员，分别为 Smad1～9。陈健（1999）、何文喜（2000，2003）、包柳郁（2001）、臧晓霞（2001）系统地研究了 Smad 分子在牙髓细胞、牙乳头细胞和成牙本质细胞中的信号转导途径，发现：Smads 信号途径存在于牙髓细胞、牙乳头细胞和成牙本质细胞内；Smads 作为 TGF－β、BMP 的细胞内信号分子，分别参与转导或反馈拮抗 TGF－β、BMP 的作用，在 TGF－β、BMP 调控靶基因表达中，Smads 分别发挥不同的作用；初步阐明了 TGF－β、BMP 调控成牙本质细胞分化时的细胞内信号途径；Smad 作为 TGF－β 细胞内信号分子，在成牙本质细胞分化和细胞外基质形成过程中发挥关键的调控作用。

FGF 家族主要有碱性 FGF（bFGF）和酸性 FGF（aFGF）两大类，分布于多种组织中，作用广泛，可诱导大多数来自间充质和神经嵴外胚层细胞的有丝分裂，稳定培养细胞表型的表达，毛细血管内皮细胞的增生和细胞的分化，在胚胎形成、血管新生、神经营养和创伤愈合等方面发挥着重要的作用。

郝建军、史俊南、牛忠英等（1997）采用免疫组化方法观察 bFGF 在人牙胚发育过程中的定位，结果发现：钟状期牙胚中前成釉细胞为 bFGF 强阳性；成牙本质细胞为强阳性，牙乳头组织中阳性分布不均，靠近成牙本质细胞的牙乳头细胞为阳性；牙囊细胞阳性，血管内皮细胞呈强阳性；骨组织为阴性。bFGF 在前成釉细胞和成牙本质细胞及其下层的表达提示，bFGF 与成釉细胞、成牙本质细胞的分化和成熟有关。

Frenz DA，Liu W，Williams JD 等（1994）用浸过 bFGF 和 BMP2 的凝胶与牙乳头间充质组织共同培养 24 h，发现两种生长因子的作用与牙源性上皮的效应相似，即能诱导间充质细胞增殖和形态的发生。还有学者发现外源性的 bFGF 可以促进大鼠牙胚的发育和细胞分化，加快牙齿发育速度。

FGF18 是 1998 年克隆的 FGF 家族新成员，是一种发育组织重要的分泌性信号分子，在骨骼和软骨的发育中发挥着重要作用。杨帆（2003）对 FGF18 在牙胚发育和牙髓组织中的作用进行了初步研究，发现 FGF18 在牙胚的发生、成牙本质细胞分化和基质矿化中发挥着一定的调控作用，还参与牙髓炎症和损伤的修复。

刘军（1998）发现 NGF 和神经肽 SP、CGRP 对人牙乳头细胞的促增殖效应可能在早期牙胚的发育、牙乳头间充质形态的形成过程中具有重要作用，它们还可调控人牙乳头细胞 ALP 活性，在成牙本质细胞分化过程中具有一定作用，而促进细胞局部环境 ALP 的分泌则

与细胞间基质的生物矿化过程有关。

转录因子是一类可以通过与下游靶 DNA 结合，从而调控下游基因转录的分子，它们接受来自生长因子等方面的信号，再将这些指令具体地传递给直接执行功能的蛋白分子。研究表明：许多转录因子在成牙本质细胞分化中起重要作用。余擎(2002)发现核心结合因子(core - binding factor a 1, cbfa1)在牙乳头细胞中上调许多细胞外基质蛋白，尤其是矿化相关基因和蛋白的表达，在成牙本质细胞分化和牙本质形成过程中起着非常重要的作用。作为转录因子，它很可能是 BMP2 等生长因子调控细胞分化和矿化的信号转导过程中的重要环节。上游刺激因子(upstream stimulatory factor1, USF1)不仅为胚胎正常发育所必需，而且能激活多种同牙齿发育有关的靶基因转录，从而调节细胞增殖、分泌活动和细胞周期的进行。吴礼安(2003)的研究发现 USF1 在牙齿发育中起着重要的作用，它参与了牙齿发育过程，并主要参与调控成牙本质细胞和成釉细胞的分化、基质分泌和矿化过程，例如参与调节成牙本质细胞合成骨桥素(OPN)和 TGF - β2。

牙齿的生长发育以及细胞的增殖和分化受到激素的调节和控制。许多亲钙激素，如维生素 D、甲状旁腺激素、胰岛素等可以调控细胞分化和组织矿化。赵大为(1997)发现：1,25 - 二羟基维生素 D3 [$1,25-(OH)_2D_3$] 对人牙乳头细胞的增殖具有抑制作用，呈现出时间和剂量的依赖关系，对 ALP 活性、骨钙素(osteocalcin, OC)分泌有增强作用。这些结果表明 $1,25(OH)_2D_3$ 可以促进人牙乳头细胞分化成熟为成牙本质细胞样细胞。王景杰(2000)在随后的研究中，发现 $1,25-(OH)_2D_3$ 有促进人牙乳头细胞矿化作用，表现在不仅能刺激 ALP 活性和 OC 分泌，而且可上调钙结合蛋白 Calbinding - D28K(CaB)的合成，增加基质对 Ca^{2+} 的摄取。另外，胰岛素作用于人牙乳头细胞产生与 $1,25-(OH)_2D_3$ 相似的结果。

陈新梅(1998)系统地研究了甲状旁腺激素(PTH)对人牙乳头细胞的作用，结果表明：PTH 可促进细胞 ALP 的分泌和细胞内 cAMP 的合成；PTH 可激活人牙乳头细胞 BMP3 的表达，通过自分泌和旁分泌作用参与细胞的诱导和分化；PTH 能显著提高人牙乳头细胞的矿化程度，促进人牙乳头细胞分化为成牙本质细胞。

三、成牙本质细胞分化的分子生物学机制

通过对现有研究成果的分析和总结，Ruch JV, Lesot H, Begue - Kim C(1995)提出发育中成牙本质细胞分化的机制和过程：牙齿发育的早期，前成釉细胞分泌以 TGF - β 为代表的生长因子，生长因子附着于基底膜上并被活化，随后与前成牙本质细胞膜上的受体作用而引发一系列信号的转导，例如 TGF - β 和 Msx 基因开放，以及膜上的 165kD(可能是 Fn 的受体)蛋白向基底膜方向迁移，致使合成的 Fn 与膜上 165kD 蛋白相互作用，Msx 基因的产物调节细胞骨架相关基因的转录，Fn、165kD 蛋白复合体转导的信号使细胞骨架重新排列并最终导致细胞极化。内源性 TGF - β 调节前期牙本质基质的转录和翻译，使分泌的基质分布于基底膜侧，FGF 和 IGF 在牙胚发育过程中与 TGF - β 相互协调，协同作用，共同完成细胞的分化和基质的分泌。

第三节　发育后成牙本质细胞的分化

即使人为去除牙胚上皮和基底膜，在牙齿发育特定的时间和空间下，牙本质的组织发

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

生照样可以启动。这种继发性牙本质的形成需要新一代的形成牙本质基质的细胞。如上所述，这些细胞与正常成牙本质细胞的形态相似，由于其表型的生化特征还未被阐明，目前被命名为成牙本质细胞样细胞、新成牙本质细胞或第二代成牙本质细胞。人们通过放射自显影技术研究了它们的起源，报道的结果不尽相同。有研究表明：新的成牙本质细胞更可能来源于其他的牙髓细胞。有报道认为：牙齿磨损后，未分化的牙髓细胞发生分裂并向修复性牙本质形成的区域迁移，这在人工露髓的实验中得到证实。Fitzgerald M, Chiego JD, Heya R 等(1990)发现切髓和盖髓治疗后，细胞分化时 DNA 至少需要复制两次：第一次发生在迁移前，第二次发生在表达新成牙本质细胞表型的修复区域。成纤维细胞、血管内皮细胞和未分化细胞可能参与继发性牙本质的形成。

现根据牙髓暴露与否分别讨论成熟牙髓环境中牙本质形成的条件。

一、露髓组织的修复

人们已经证实在控制细菌感染的条件下，通过在露髓点下形成牙本质桥而修复活髓，在大鼠和豚鼠尖牙以及灵长类动物的切髓术中已经观察到了牙髓的这一钙化潜力。大多数关于修复性牙本质形成的证据来自于盖髓实验，但由于诸多因素如炎症、出血、牙本质碎屑等的影响，盖髓治疗并不是研究修复性牙本质形成和相关的成牙本质细胞分化的理想的实验模型 。

Schroderu(1985)综述了用氢氧化钙盖髓的修复过程：创伤面下的细胞增殖、迁移，在牙髓的坏死区周围分泌新的胶原。坏死区和新生胶原层矿盐沉积，形成矿化基质(包括纤维性牙本质和骨性牙本质)。纤维性牙本质是一种由非极性牙髓细胞分泌的非管状基质，随着分泌量的增加并无特异生物合成效应。在纤维性牙本质中也有硬组织(骨性牙本质)形成。与非极性基质分泌相关的细胞呈圆形，胞浆细胞器少，也有的呈柱状，并有发育良好的接近细胞核的内质网和高尔基体。正常牙髓组织中，骨性基质分泌物的极化呈进行性。最后，新成牙本质细胞层与纤维性牙本质相伴，分泌的管状基质以前期牙本质样形式排列。

氢氧化钙并不是启动修复性牙本质形成的特异因子。这是因为用氢氧化钙处理损伤的牙髓 10 min 便足以诱导牙本质桥的形成，提示氢氧化钙的效应是由于化学创伤引起的。与此相反，用含有氢氧化钙的硬质盖髓剂进行直接盖髓，不引起组织坏死，在盖髓和露髓处形成纤维性牙本质层，同时也出现管状基质。此外，其他许多材料，如磷酸钙、氧化锌丁香油、胶原，甚至特氟隆，在动物实验中均可诱导硬组织形成，复合树脂、硅水门汀、磷酸锌水门汀和其他金属复合材料均有此效应。这些实验清楚地显示在露髓点较小时，牙本质桥的形成并不需要成牙本质细胞的分化。人们用硬质氢氧化钙水门汀盖髓观察猴的牙本质桥形成的起始阶段，发现靠近盖髓剂的成牙本质细胞亦合成非管状基质。Tziafas D(1995)研究了牙髓细胞与含氢氧化钙水门汀之间的相互作用，观察到血清中的 Fn 与水门汀表面微晶有高度的亲和性，富含 Fn 的成纤维细胞也与水门汀及其晶体结构关系密切。

陈筠(1991)的研究表明：氢氧化钙具有促进猴的牙本质 - 牙髓复合体自我修复潜力的发挥、诱导新生牙本质桥生成的作用，适当增加培养液中 Ca^{2+} 浓度可促进体外培养的大鼠牙髓细胞 DNA、RNA 合成。盖髓剂中的 Ca^{2+} 不直接参与新生牙本质桥形成，但可在损伤变性层和侧壁受切割牙本质小管中沉积。氢氧化钙不仅促进细胞的核酸合成，还可促进 ALP 基因转录水平的表达，从而提高最终形成的 ALP 量。因此，氢氧化钙可通过激活牙髓细胞

中 ALP 的基因表达而促进牙髓、牙本质的修复。碱性环境对水解有强烈激活作用，但牙髓细胞 ALP 活性和基因表达水平的提高，不仅依赖于药物的强碱性，也依赖于其所具有的阳离子。二者共同作用，通过促进细胞的合成代谢和激活钙化酶类而促进牙髓、牙本质的修复。

与其他结缔组织创伤相似，牙髓暴露后，在创面下先形成胶原，然后吸附钙离子沉积。牙髓组织对于轻度刺激的正常反应是由成纤维细胞或骨性牙本质母细胞(osteodentinoblast)分泌一层基质来保护牙髓。分化完全的成牙本质细胞启动管状牙本质形成需要细胞与基质间进一步的相互作用，这种作用不依靠任何盖髓材料。同时这种作用还影响具有特殊形态和功能的牙髓细胞的运动和排列，由于黏附分子 Fn 与胶原基质间存在极强的亲和性，在牙髓组织的基质与细胞相互作用中，Fn 起着重要的介导作用。

二、非露髓组织的修复

新分化的成牙本质细胞代替受损的细胞形成修复性牙本质是牙髓组织修复的重要部分。下列情况中会出现原始成牙本质细胞的坏死：

(一)牙齿表面的局部损伤。如快速进行性的龋损、牙齿磨损、充填术和冠折。

(二)牙胚移植或牙齿根切过程中的损伤，抗有丝分裂药物引起的系统损伤、神经反应、局部刺激以及维生素 A 和维生素 C 缺乏等。

人们观察了这两种情况下成牙本质细胞被替换的生物学过程。局部牙髓受损后破坏了原始的成牙本质细胞，有潜能的牙髓细胞(主要位于多细胞区)进入活跃的有丝分裂期。梭形细胞向坏死区迁移，并分化成为长的极化细胞，这些细胞具有分泌管状牙本质的能力。通过观察抗有丝分裂药物的作用也得出了相似的结果，Senzaki H(1980)注射秋水仙素引起成牙本质细胞坏死，紧靠牙本质下方的细胞增殖，梭形细胞分泌胶原基质，极化细胞形成管状牙本质。Atkison ME(1989)利用放射自显影技术观察了小鼠磨牙移植后胶原形成的两个阶段。首先，退变的细胞形成纤维性牙本质，随后细胞器少的立方状细胞合成呈极性排列的基质，最后才出现新分化的成牙本质细胞。Heritier M, D'Angleterre M, Bailliez Y(1989)观察了小鼠牙胚移植后新生的成牙本质细胞的超微结构，经过术后的初始阶段，排列于新生前期牙本质周围的梭形细胞形成一层具有成牙本质细胞表型特征的细胞，这些细胞与新形成的管状牙本质基质有关。单独移植牙髓组织不能引发成牙本质细胞的分化，但可形成骨性硬组织。牙胚移植后新的成牙本质细胞是由原始牙本质诱导的，而与牙本质基质中的胶原和氨基多糖成分无关。Takei K, Inone I, Shimono M 等(1988)进一步的研究发现，牙髓组织之所以具有形成骨、软骨或牙本质的能力是与其周围环境有关。牙髓组织种植于髓腔后，牙髓细胞表达成牙本质细胞表型不仅需要纤维网状支架，而且取决于是否有丰富的血液供应。牙齿的异体或自体移植为人们研究损伤后牙髓组织创伤愈合的过程提供了较理想的模型，这些实验结果与局部牙髓损伤相吻合。来源于牙髓外胚间充质的细胞合成管状牙本质，而纤维性牙本质介导细胞的极化，牙齿再植后纤维性牙本质基质中管状结构的形成提示原始成牙本质细胞功能的改变或被迅速替代。

原始成牙本质细胞被破坏后，牙髓细胞向周边牙本质迁移，并发生极化，表达成牙本质细胞的表型特征，进而启动管状牙本质组织的发生。这一过程需要从两个方面验证：一个是调节细胞增殖和向周边牙本质迁移的因素；另一个是细胞与基质的相互作用。这两者对

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

新生成的成牙本质细胞分化都是必要的,原始成牙本质细胞与多细胞区细胞之间的联系可能调控细胞的迁移。此外,退变的成牙本质细胞分解产物的刺激,多功能牙本质蛋白的诱导,或者创伤结缔组织中细胞的非特异反应等均可累积作用于创伤组织处,这些对于细胞的迁移效应不可忽视。但是,随后细胞的黏附和极化似乎仅受牙本质基质和牙髓细胞相互作用的调控。已有实验证明,在牙髓中植入牙本质或前期牙本质后,细胞发生黏附,牙本质形成开始启动。牙本质和牙髓细胞相互作用的结果导致极性管状牙本质的形成,或者是非极性纤维性牙本质产物的出现。这些结果受到如下组织状况的影响:血管分布和神经支配,前成牙本质细胞和成牙本质细胞前体细胞的状况,周围牙本质和迁移细胞之间黏附分子(Fn 等)的分布状况等。有文献报道:间充质细胞的分化与血管中氧含量和周围基质的作用用紧密相关。

三、特异的诱导效应

(一)牙本质和牙髓细胞的相互作用

机械露髓时落入牙髓的牙本质碎屑能刺激修复性牙本质的形成,脱矿牙本质基质、前期牙本质、酸处理或正常的牙本质等种植于年轻成熟牙髓后,也具有相同的诱导作用。脱矿牙本质在肌肉、皮肤、骨髓和牙周膜组织中诱导骨形成的能力不断得到证明。牙本质非胶原成分中含有 BMP,对培养的成纤维细胞有促进有丝分裂的效应。Amar S, Sires B, Sabsay B 等(1991)分离并部分纯化了一种大鼠牙本质基质多肽,它与 TGF、BMP 结构特征不同,在体外亦有诱导软骨形成的效应。

Tziafas D, Kolokuris I, Alvanou A 等(1992)用脱矿、未脱矿和前期牙本质盖髓,在紧靠前期牙本质的部位有新的成牙本质细胞分化,在与脱矿牙本质直接接触的部位出现散在的极化细胞。脱矿和未脱矿牙本质诱导形成的牙本质中,由梭状或多边形细胞合成的新基质可诱导新的成牙本质细胞的分化。用脱矿牙本质盖髓,损伤牙髓区的局部因素(炎症反应、血管再生受限和组织修复性的延缓)可能影响着骨性牙本质母细胞(osteodentinoblast)的发育。去除这些盖髓材料中的 BMP 可能使诱导牙本质形成的作用延缓,甚至终止。用粗制异源性 BMP 盖髓可以刺激牙髓细胞的有丝分裂,并且只能观察到骨性牙本质细胞(ostodentinocyte)的发育。应用牙本质基质明胶盖髓,术后 4 周有完整的牙本质桥形成,牙本质桥主要由骨性牙本质构成,牙本质基质明胶促进牙本质形成取决于其中含有的 BMP。

用牙本质蛋白(经 EDTA 溶解和胶原酶处理)给雪貂牙齿盖髓可以诱导修复性牙本质的形成,在年轻的动物中有管状牙本质的形成,而年老的动物中只有骨性牙本质的沉积。成年动物牙髓对牙本质基质的诱导反应与年轻动物牙髓不同。在成年狗牙髓中植入牙本质,可观察到有牙本质的形成。而脱矿牙本质植入物的周围有纤维性结缔组织或基质降解产物包绕,同时牙髓周边的牙本质沉积反应也增强,提示植入牙本质成分有进一步促进原始成牙本质细胞生物合成效应。

脱矿骨基质植入牙髓可诱导骨性牙本质的形成,这是因为骨基质和脱矿牙本质对非牙髓起源的间充质细胞有相似的诱导作用。而将脱矿牙本质植入狗的牙乳头组织中可诱导骨样基质的合成,若把脱矿骨植入其中则不能形成硬组织。

(二)牙髓细胞与基质的相互作用

Nakashima M(1989,1990)用骨 BMP 植入狗牙髓腔观察牙髓对 BMP 的反应,结果表明管

状牙本质的形成需要由非极化细胞分泌非管状基质来启动,管状牙本质是由完全分化的成牙本质细胞分泌。因此,可以推测,牙髓细胞分化为成牙本质细胞似乎不需要盖髓剂的特殊作用,而是取决于细胞与基质的相互作用,这种相互作用可能影响新的成牙本质细胞表型的表达,并可调节牙髓细胞的迁移、增生和分化过程。

Tzafas D，Kolokuris I，Alvanou A 等(1992)将 1mg/mL 异源性血浆 Fn 处理的 millipore 滤膜用于成年狗牙盖髓,7 d 后紧靠滤膜处出现一层极化细胞,这些细胞有发达的粗面内质网和微丝。4 周后,有一厚层牙本质样基质包绕滤膜。对照组(PBS 或狗血清白蛋白)和低浓度 Fn(0.2 mg/mL)均无诱导牙本质形成的作用。在人工露髓的年轻狗牙中用复合 Fn 的 millipore 滤膜作为盖髓材料不能诱导细胞分化和牙本质桥的形成,这可能是结晶物沉积于浓缩的 Fn 表面,从而阻止牙髓细胞的形态发生。Fn 及胶原蛋白Ⅰ、Ⅲ等是牙髓组织的主要的细胞外基质蛋白，贾东(1998)观察了用 TGF－β1－HA(羟基磷灰石,hydroxyapatite)、TGF－β1、Calvital、氢氧化钙等在狗牙盖髓后上述几种细胞外基质蛋白的变化,发现牙髓修复过程中 Fn 的量增加，Fn 可能介导了 TGF－β 及其复合材料、氢氧化钙制剂等对牙髓创伤修复的诱导过程。胶原蛋白Ⅰ、Ⅲ参与了修复性牙本质的形成。汪平(1995)观察不同浓度 Fn 对培养人牙髓细胞的作用,发现中等浓度的 Fn 可促进牙髓成纤维细胞增殖和 DNA 合成,ALP 活性增高。Fn 是牙髓细胞的正增殖因子,尤其是高浓度 Fn 对牙髓细胞向成牙本质细胞分化的调节作用尤为明显。通过器官培养发现 Fn 可促进牙髓细胞的迁移,这是牙髓修复不可缺少的生理基础。通过 Fn 复合材料的狗牙盖髓实验,发现术后创面的骨样牙本质沉积较多,说明外源性 Fn 可促进牙髓组织修复。

NCPs 能诱导修复性牙本质生成,故又称牙本质形成蛋白。用牙本质基质成分置于露髓处诱导修复性牙本质形成,可见新一代的成牙本质细胞样细胞排列在组织形成表面。但是,实验所用牙本质基质蛋白是牙本质细胞外基质经 EDTA 和胶原酶溶解的成分,除含有 NCPs 外,还可能含有某些生长因子。目前国内外学者正在进行纯化的牙本质特异蛋白,如 DPP、DSP、DMP1 以及 DSPP 直接盖髓的实验研究。

(三)细胞因子的诱导效应

细胞因子很可能参与了修复性牙本质生成过程,研究显示:TGF－β、BMP、bFGF、IGF 和血小板衍生生长因子(platelet－derived growth factor，PDGF)均有刺激修复性牙本质生成的能力,而以 TGF 作用最强。在成人牙齿中成牙本质细胞和其他一些牙髓细胞表面存在 TGF 的Ⅰ型和Ⅱ型受体表达,证实了这些细胞中存在着 TGF 诱导成牙本质细胞样细胞分化的信号转导活性物质。牙本质－牙髓复合体中自分泌形成的 TGF－β 在调控成牙本质细胞的活性方面非常重要。TGF－β 经合成、分泌后陷落于牙本质中,在特定条件下,如龋坏等导致牙本质分解而使 TGF－β 释放,进而刺激反应性牙本质的生成。

Martin A，Unda FJ，Begue－Kim C 等(1998)观察了 aFGF,bFGF,TGF 和 IGF－Ⅰ对成牙本质细胞分化的影响,结果表明在体外培养条件下,aFGF 或 bFGF 单独作用时都不能诱导成牙本质细胞分化,而 aFGF 和 bFGF 与 IGF－Ⅰ或 TGF－β 共同作用时可发挥作用,促进牙乳头细胞的极化和功能性分化,说明生长因子之间可能存在着协同作用。

果树林(1997)以狗实验性牙髓炎和牙髓损伤修复为模型,采用免疫组织学手段观测了 TGF－β、EGF 和 TNF－α 在牙髓炎症和修复过程中的分布和变化,并观察了黏附分子 ICAM－1 与炎症反应的关系。结果提示牙髓组织在受到外界刺激之后,局部可以合成和分泌

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

TGF－β、EGF 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor－α，TNF－α)等细胞因子，这些因子可能和其他介质一起，组成一个内容丰富、关系复杂的网络系统，调节牙髓的炎症和修复反应。

热休克蛋白(heat shock protein，HSP)是一切生物细胞，包括原核细胞和真核细胞受到热或者病原体、理化因素等有害刺激后，启动一系列特殊基因编码合成的蛋白质。HSP 具有分子伴侣功能，参与免疫调节，抑制炎症发展，对于维持细胞在应激状态的生存及加速损伤修复有重要意义。王晓方(2000)观察大鼠磨牙受到钻磨刺激后 HSP 的表达模式，结果提示 HSP70 在牙髓组织受到外界损伤时，对于减轻损伤、维持牙髓组织正常功能有重要作用。HSP70 很可能参与牙髓损伤修复的全过程，在早期抵抗应激刺激维持细胞生存，限制炎症扩散，晚期参与牙髓修复。

(四) 假说

上述实验有力地证实：稳定地黏附于高浓度 Fn 表面的牙髓细胞在适宜的环境下可以分化成新的成牙本质细胞，Veron MH，Couble ML，Caallot G 等(1990)提出牙髓细胞在 Fn 上的排列可以通过反馈机制来抑制糖蛋白的合成，并且进一步调节这些细胞的成牙本质细胞表型的表达。这一机制可能解释牙本质基质植入牙髓组织后，牙本质形成被激活这一现象。目前认为：Fn 与牙本质基质之间有高度亲和力，Fn 与基质的吸附可能导致细胞黏附增强和加快，然后通过以上反馈效应基因开放，细胞随之分化。这一假说可以解释牙髓细胞对各种牙本质基质有不同的反应。前期牙本质具有细胞黏附和极化所需要的表面，但分散的正在极化的细胞与脱矿牙本质的关系密切。前期牙本质直接诱导新成牙本质细胞的分化归因于其表面的胶原纤维充分暴露于与之相互作用的 Fn，而脱矿牙本质的胶原被其他分子(可能是非胶原蛋白)部分覆盖。通常情况下，牙本质的有机成分是被无机盐所覆盖。细胞培养实验也证实：Fn 启动内皮和牙周膜细胞黏附于脱矿牙本质表面的能力要比黏附于牙本质表面更强。

如果牙本质诱导牙本质形成的机制能得到证实的话，那么人们会对以往实验中牙本质基质特异的诱导因子的作用提出质疑。这些因子在非牙髓部位具有形成软骨和骨的能力，但是如果牙本质基质暴露之后，牙本质的组织发生受吸附的 Fn 的调控，那么这些因子究竟起何作用？在没有其他的功能分子参与的情况下，用仅含 Fn 的材料盖髓可以诱导新的牙本质的形成。这一实验证实：在年轻的牙髓中(至少含许多牙齿始祖细胞和高浓度的形态发生因子)无需其他外源因子，含 Fn 的界面就可以引起牙髓细胞的反应而表达成牙本质细胞的表型。而在成年牙齿中，形成继发性牙本质之前需要进一步调节牙髓的环境，这可能是随着年龄的增加牙齿始祖细胞和形态发生因子随之减少所致。牙本质基质所含的诱导因子可以在适宜的界面调节细胞增殖、迁移和黏附，进而启动牙本质的形成，影响成年牙髓。牙髓细胞受牙本质基质中 TGF－β 样分子的调节，这个与其他基质相互作用的分子代表了牙齿上皮和间充质细胞的一个生物活性单元。

第四节　二次启动牙本质形成的调控

众所周知，细胞外基质能够调节细胞的特异性，细胞表面蛋白变化能够导致相似细胞表达不同的表型。牙髓细胞与周围基质的相互作用可以调节细胞的生物合成作用，牙髓细胞动力学是由遗传学程序(genetic program)决定的。分化或去分化的牙髓细胞经过数次细

胞周期成为潜在前成牙本质细胞。这些有分化为原始或新成牙本质细胞潜能的细胞，仅需要特殊的细胞外基质作用就可开始分化。牙齿发育期间，牙乳头细胞的遗传特征已程序化。牙髓修复(露髓、原始成牙本质细胞破坏)或牙本质与牙髓相互作用中牙髓细胞出现额外次数的细胞周期，未分化的牙髓细胞直接分化为潜在的前成牙本质细胞，而其他牙髓细胞(成纤维细胞、内皮细胞或周皮细胞)去分化，然后成为前成牙本质细胞。

根据以上假说，牙髓细胞外基质能够指导正在分裂的牙髓细胞沿两个方向生长和分化：

1. 非定向的前成牙本质细胞(由于缺乏合适的界面或周围环境的改变，血液来源的氧供应不足或严重的炎症反应)在修复过程中分泌非极性类型的基质。

2. 黏附(稳定)牙髓细胞分泌极性的基质，但这取决于细胞的分化状态和作用界面的结构和化学特性：

(1)在能与 Fn 作用的基质面上，前成牙本质细胞定向排列，可以通过跨膜的细胞骨架作用导致牙髓细胞极化，并分泌管状基质。

(2)未分化或去分化的牙髓细胞进行必要的最少次数的细胞周期之前，在不出现极化的情况下就可以分泌极性的基质。这些非管状基质(纤维性牙本质)可以与基底膜或牙本质基质以同样方式激发新成牙本质细胞表型的表达。

以上结果似乎需要一个稳定的牙髓环境：无严重的炎症反应、足够的细胞密度、适当的血供和适宜浓度的形态组织蛋白。非炎症年轻恒牙的牙髓组织就是这样一个环境。

(郝建军，王捍国)

参考文献

1. Atkinson ME. The role of host tissue in repair of transplanted mouse molar teeth: a reappraisal of induction of odontoblasts during tooth development and repair. Arch Oral Biol. 1976; 21: 91
2. Thesleff I. Role of the basement membrane in odontoblast differentiation. J Biol Buccale. 1978; 6: 241
3. Senzaki H. A histological study of reparative dentinogenesis in the rat incisor after colchicine administration. Arch Oral Biol. 1980; 25: 737
4. Lesot H, Osman M, Ruch JV. Immunofluenorescent localization of collagens, fibronectin and laminin during terminal differentiation of odontoblasts. Dev Biol. 1981;82:371
5. Inoue T, Sasaki A, Yamamura T. Bone morphogenesis induced by implantation of dentin and cortical bone matrices. Bull Tokyo Univ Dent Coll. 1981;22:213
6. Veis A. The role of dental pulp thoughts on the session on pulp repair processes. J Dent Res. 1985; 64: 552
7. Ruch JV. Odontoblast differentiation and the formation of the odontoblast layer. J Dent Res. 1985; 64:489
8. Lesot H, Karcher – Djuricic V, Meyer JM, et al. Dental cell interaction with extracellular matrix constituents: type I collagen and fibronectin. Differentiation. 1985;29:171
9. Schroder U. Effects of calcium hydroxide – containing agent on pulp cell migration proliferation and differentiation . J Dent Res. 1985;64:541
10. Butler WT. Dentin specific proteins. Methods Enzymol. 1987; 145: 290
11. Thesleff I, Mackie E, Vainio S, et al. Changes in the distribution of tenascin during tooth development. Development. 1987;101(2):289
12. Cvek M, Granath L, Cleaton – Jones P, et al. Hard tissue barrier formation in pulpotomized teeth capped with cyanoacrylate or calcium hydroxide for 10 and 60 minutes. J Dent Res. 1987; 66: 1166

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

13. Lesot H, Karcher - Djuricic V, Ruch JV. Membrane - cytoskeleton interactions: inhibition of odontoblast differentiation by monoclonal antibody against a membrane protein. Differentiation. 1988;37;62
14. Takei K, Inoue T, Shimono M, et al. An experimental study of dentinogenesis in autografted dental pulp in rats. Bull Tokyo Univ Dent Coll. 1988; 29: 9
15. Terranova V. Extracellular matrix molecules modulate the phenotype of the resident cells: mechanism of periodontal ligament cell and endothelial cell adherence to dentin . IN: Davidocitch Z, ed. Biological Mechanisms of Tooth Eruption and Root Resorption . Birmingham: BSCO Media. 1988;23 - 34
16. Herttier M, D'Angleterre M, Bailliez Y. Ultrastructure of a new generation of odontoblasts in grafted coronal tissues of mouse molar tooth germs. Arch Oral Biol.1989; 34: 875
17. Veis A, Sires B, Clohisy JA. Search for the osteogenic factor it dentin, Rat incisor dentin contains a factor stimulating rat muscle cells in vitro to incorporate sulphate into an altered proteoglycan. Connect Tissue Res. 1989;23: 137
18. Nakashima M. Dentin induction by implants of autolyed antigen - extracted allogenic(AAA) dentin of amputated pulps of dogs . Endod Dent Traumat. 1989; 5: 279
19. Jepsen S, Schiltz P, Strong DO, et al. Ultrastructure of a new generation of odontoblasts in grafted coronal tissues of mouse molar tooth germs. Arch Oral Biol. 1989; 34: 875
20. Ruch JV. Odontoblasts: developmental aspects. In: Luoki R, Kudo T, Olgart L, eds. Dynamic Aspects of the Dental Pulp. London, UK: Chapman and Hall. 1990; 29
21. D'Souza RN, Happonen RP, Ritter NM, et al. Temporal and spatial patterns of transforming growth factor - β1 expression in developing rat molars. Arch Oral Biol.1990; 35:957
22. Chiego DJ, Wang RF, Amsel L. An autoradiographic and ultrastructural study of primary and secondary odontoblasts. J Dent Res. 1990; 69:169
23. Tziafas D, Kolokuris I. Inductive influences of demineralized dentin and bone matrix on pulp cells: and approach of secondary dentinogenesis. J Dent Res. 1990; 69: 75
24. Fitzgerald M, Chiego JD, Heya R. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. Arch Oral Biol. 1990;35:707
25. Herttier M, D'Angleterre M, Bailliez Y. Differentiation of odontoblasts in mouse dental papillae recombined with normal or chemically - treated dentinal matrices. Arch Oral Biol.1990; 35: 917
26. Nakashima M. The induction of reparative dentine in the amputated dental pulp of the dog by bone morphogenetic protein. Arch Oral Biol. 1990b; 35: 493
27. Smith AJ, Tobias RS, Plant GC, et al. In vivo morphogenetic activity of dentine matrix protein. J Biol Buccale. 1990; 18:123
28. Veron M - H, Couble M - L, Caillot G, et al. Expression of fibronectin and type I collagen by human dental pulp cells and gingiva fibroblasts grown on fibronectin substrate. Arch Oral Biol. 1990; 35:565
29. Slavkin HC. Molecular determinants during dental morphogenesis and cytodifferentiation: A review. J Craniofac Genet Dev Biol. 1991;11:338
30. Millan FA, Denhez F, Kondaiah P, et al. Embryonic gene expression patterns of TGF beta 1, beta 2 and beta 3 suggest different developmental functions in vivo. Development. 1991 Jan;111(1):131
31. 陈筠. 牙髓碱性磷酸酶的提纯、cDNA 克隆和氢氧化钙对其活性、表达的影响. 第四军医大学博士学位论文. 1991
32. Amar S, Sires B, Sabsay B, et al. The isolation and partial characterization of a rat incisor dentin matrix polypeptide with in vitro chondrogenic activity. J Biol Chem. 1991;266: 8609
33. Thesleff I, Vaahtokari A. The role of growth factors in determination and differentiation of the odontoblastic

cell lineage. In: Kim S, ed Proceedings of Finnish Dental Society. 1992;20 (Suppl 1):357

34. Begue – Kim C, Smith AJ, Ruch JV, et al. Effect of dentin proteins, transforming growth factor 1(TGFβ1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on differentiation of odontoblasts in vitro. Int J Del Biol. 1992; 36:491
35. Tziafas D, Kolokuris I, Alvanou A, et al. Short – term dentinogenic response of dog dental pulp tissue After its induction by demineralized and native dentine or predentin. Arch Oral Biol.1992; 37: 119
36. Tzafas D, Molyvdas I, Veis A. Fibronectin – induced precipitation in sites of dental pulp exposure. J Dent Res. 1992;71:657
37. Tziafas D, Alvanou A, Kaidoglou K. Dentinogenic activity of allogenic plasma fibronection on dog dental pulp. J Dent Res.1992b; 71:1189
38. Tziafas D, Lambrianidis Th, Beltes P. The inductive effect of native dentin of the dentiogenic potential of adult dog teeth. J Endod. 1993;19:166
39. Tziafas D. Mechanisms controlling secondary initiation of dentinogenesis. Int Endod J. 1994;27:61
40. Lesot H, Smith AJ, Tziafas D, et al. Biologically active molecules and dental tissue repair: A comparative review of reactionary and reparative dentinogenesis with the induction of odontoblast differentiation in vitro. Cell Materials. 1994;4(3):199
41. Yoshiba N, Yoshiba K, Iwaku M, et al. A confocal laser scanning microscopic study of the immunofluorescent localization of fibronectin in the odontoblast layer of human teeth. Arch Oral Biol. 1994;39(5):395
42. Nakamura M, Bringas P Jr, Nanci A, et al. Translocation of enamel proteins from inner enamel epithelia to odontoblasts during mouse tooth development. Anat Rec. 1994;238(3):383
43. Begue – Kim C, Smith AJ, Loriot M, et al. Comparative analysis of TGFβs, BMPs, IGF, mxms, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expressions during normal and in vitro induced odontoblast differentiation. Int J Del Biol. 1994; 38:405
44. 郝建军、史俊南．成纤维细胞生长因子家族的研究进展．牙体牙髓牙周病学杂志．1994;4(2):111
45. Frenz DA, Liu W, Williams JD, et al. Induction of chondrogenesis: requirement for synergistic interaction of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor – beta. Development. 1994;120:415
46. 高玉好、杨连甲．牙本质基质明胶盖髓的实验研究．牙体牙髓牙周病学杂志．1994;4(1):3
47. Ruch JV. Tooth crown morphogenesis and cytodifferentiations: candid questions and critical comments. Connect Tissue Res. 1995;32(1 – 4):1
48. Butler WT, Ritchie H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. Int J Del Biol. 1995; 39:169
49. Heikinheimo K, Salo T. Expression of basement membrane type IV collagen and type IV collagenases (MMP – 2 and MMP – 9) in human fetal teeth. J Dent Res. 1995;74(5):1226
50. Meyer JM, Ruch JV, Kubler MD, et al. Cultured incisors display major modifications in basal lamina deposition without further effect on odontoblast differentiation. Cell Tissue Res. 1995;279(1):135
51. 汪平．纤维黏连蛋白与牙髓细胞分化、牙髓组织修复关系的研究．第四军医大学博士学位论文．1995
52. Tziafas D. Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. Int J Dev Biol. 1995;35(1):281
53. Ruch JV, Lesot H, Begue – Kim C. Odontoblast differentiation. Int J Del Biol. 1995; 39:51
54. Tziafas D, Panagiotakopoulos N, Comnenou A. Immunolocalization of fibronectin during the early response of dog dental pulp to demineralized dentine or a calcium hydroxide – containing cement. Arch Oral Biol. 1995; 40(1):23

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

55. 郝建军、史俊南. 体外牙胚培养在成牙本质细胞分化研究中的应用. 国外医学口腔分册. 1996; 23(1):14
56. 陈智、樊明文. 成牙本质细胞的终末分化. 国外医学口腔分册. 1997;24(3):141
57. 樊明文、边专. 牙本质非胶原蛋白及其对成牙本质细胞的诱导. 中华口腔医学杂志. 1997;32(2): 124
58. Ritchie HH, Berry JE, Somermant MJ, et al. Dentin sialoprotein (DSP) transcripts: developmentally - sustained expression in odontoblasts and transitent expression in pre - ameloblasts. Eur J Oral Sci. 1997; 105: 405
59. Begue - Kir C, Ruch J - V, Butler WT et al. Comparative analysis of mouse DSP and DPP expression in odontoblasts, preameloblasts, and experimentally induced odontoblast - like cells. Eur J Oral Sci. 1997; 105: 231
60. Macdougall M, Simmons D, xianghong Luan, et al. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. J Biol Chem. 1997; 272(2): 835 - 842
61. 果树林、文玲英. 生长因子在损伤修复中的作用. 国外医学口腔分册. 1997;24(3):144
62. 郝建军、史俊南、牛忠英等. 碱性成纤维细胞生长因子在人牙胚中表达的免疫组化定位. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1997;7(3): 183
63. 郝建军、史俊南、牛忠英等. 碱性成纤维细胞生长因子对体外大鼠牙胚分化的影响. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1997;7(3):180
64. 赵大为. 人牙乳头细胞的体外培养和生物学特性的研究. 第四军医大学博士学位论文. 1997
65. Toyono T, Nakashima M, Kuhara S, et al. Temporal changes in expression of transforming growth factor - beta superfamily members and their receptors during bovine preodontoblast differentiation in vitro. Arch Oral Biol. 1997;42(7):481
66. 果树林. 牙髓炎症及修复过程中几种生长因子的分布与变化. 第四军医大学硕士学位论文.1997
67. Begue - Kirn C, Ruch JV, Ridall AL, et al. Comparative analysis of mouse DSP and DPP expression in odontoblasts, preameloblasts, and experimentally induced odontoblast - like cells. Eur J Oral Sci. 1998;106 (Suppl 1):254
68. 刘军. 神经生长因子和神经肽对牙乳头间充质细胞和牙胚生长、分化影响的体外实验研究. 第四军医大学博士学位论文. 1998
69. 陈新梅. 甲状旁腺激素对牙乳头间充质细胞、组织影响的实验研究. 第四军医大学博士学位论文. 1998
70. 贾东. 转化生长因子 - β1 对牙髓修复影响的实验研究.第四军医大学硕士学位论文.1998
71. Martin A, Unda FJ, Begue - Kirn C, et al. Effects of aFGF, bFGF, TGFbeta1 and IGF - Ⅰ on odontoblast differentiation in vitro. Eur J Oral Sci. 1998;106(Suppl 1):117
72. 江卫民.小鼠牙本质涎磷蛋白 cDNA 克隆、表达、纯化、抗体制备及其组织表达特异性研究.第四军医大学博士学位论文.1999
73. 张莹. TGF - β对牙乳头细胞生长的影响及其受体在牙胚和牙髓中的分布研究. 第四军医大学硕士学位论文. 1999
74. 苏凌云. 人和大鼠牙齿发育过程中 TGF - β1 - 3 的表达及作用研究. 第四军医大学硕士学位论文. 1999
75. 陈健. 人牙髓细胞 Smad2 基因 MH2 结构域的 cDNA 克隆及其在大肠杆菌中的表达. 第四军医大学硕士学位论文. 1999
76. 张莹、张郁. 牙髓组织损伤修复的机制. 国外医学口腔医学分册.1999;26(4):241

77. Gu K, Chang S, Ritchie HH, et al. Molecular cloning of a humen dentin sialophosphoprotein gene. Eur J Oral Sci. 2000;108(1):35 - 42
78. 何文喜. 人牙乳头细胞内 Smad1 在 BMP2 信号转导中作用的研究. 第四军医大学硕士学位论文. 2000
79. 王景杰. Calbinding - D28K 在人牙齿及牙胚发育过程中的分布及其在牙乳头细胞体外矿化过程中的合成与调节. 第四军医大学硕士学位论文. 2000
80. 王晓方. 热休克蛋白 70 在牙髓损伤修复过程中生物学作用的实验研究. 第四军医大学硕士学位论文. 2000
81. 史俊南主编. 现代口腔内科学. 北京:高等教育出版社,2000
82. 张蓉、肖明振、赵守亮等. 小鼠牙胚及软骨组织中牙本质涎磷蛋白基因的克隆. 牙体牙髓牙周病学杂志.2001;11(4):213 - 5
83. 包柳郁. 人牙髓细胞内的 Smad2、3 在 TGF - β1 信号转导中作用的研究. 第四军医大学硕士学位论文. 2001
84. 臧晓霞. 人牙乳头细胞内 Smad5、6 在 BMP2 信号转导中作用的研究. 第四军医大学硕士学位论文. 2001
85. 林媛. 釉质溶解素在牙胚发育和牙髓组织细胞外基质改建中的作用及其调控的研究. 第四军医大学硕士学位论文. 2001
86. 张莹、史俊南、顾淑萍. 人牙本质涎磷蛋白成熟肽 cDNA 的克隆、序列分析和原核表达. 第四军医大学学报.2002; 23(9):835
87. 张莹. 人牙本质涎蛋白基因克隆、表达和功能研究. 第四军医大学博士学位论文.2002
88. 金涛. MMP - 2 在牙胚发育和牙髓组织炎症中作用的研究. 第四军医大学硕士学位论文. 2002
89. 余擎. 核心结合因子 a1 在牙齿发育矿化中作用机制的研究. 第四军医大学博士学位论文. 2002
90. 赵守亮. 第三期牙本质的生成和活髓保存治疗. 牙体牙髓牙周病学杂志. 2002;12(12):681
91. 张敬雷. 牙本质磷蛋白在牙齿发育中表达及其调控的研究. 第四军医大学硕士学位论文. 2003
92. 何文喜. Smads 信号分子在成牙本质细胞分化中作用的研究. 第四军医大学博士学位论文. 2003
93. 杨帆. 牙胚成纤维细胞生长因子 18 基因克隆、表达及其功能研究. 第四军医大学博士学位论文. 2003
94. 吴礼安. 转录因子 USF1 在小鼠牙齿发育中的作用研究. 第四军医大学博士学位论文.2003
95. Qin C, Brunn JC, Cadena E, et al. Dentin sialoprotein in bone and dentin siolophosphoprotein gene expressed by osteoblasts. Connel Tissue Res. 2003;44 suppl 1:179
96. Baba D, Qin C, Brunn JC, et al. Detection of dentin sialoprotein in rat periodontium. Eur J Oral Sci. 2004 Apr; 112(2):163

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

第五章　牙髓生理学

第一节　牙髓微循环生理

牙髓组织由细胞、细胞间质、血管、淋巴管和神经所组成,充满于髓腔内。

牙髓组织内有丰富的血管,除了供给牙髓组织本身营养外,还可以通过牙本质小管供给牙本质和釉质营养。

一、牙髓血管

牙髓组织被牙本质包绕,通过根尖孔和侧支根管与外界相通,牙髓血管处于一种特殊环境中。

近100年来,许多学者采用不同的方法,对牙髓血管形态等方面进行了大量的研究。Lepkowski(1897)将Berlin blue注入胎儿心血管,观察到下牙槽动脉的分支一直可进入牙乳头;Welling AW(1925)用组织学方法,观察了牙本质下方毛细血管的结构。Kramer IRH(1951,1960,1968)报道牙髓内存在着动静脉吻合;Provenza DV(1985)对牙髓血管动静脉吻合的结构进行了较详细观察;Kindlova M, Metena V(1959)将大鼠、蒲宣雄(1961)将狗的牙髓血管中注入树脂,立体观察牙髓血管网。岸好彰、高桥和人、横地千仞等(1976),岸好彰、高桥和人(1977),岸好彰(1982),高桥和人(1992),岸好彰(1993)将黏度极低的合成树脂注入狗的颌骨,成功地制作了牙髓血管铸型标本,其中包括有毛细血管,并采用扫描电镜对牙髓血管铸型进行了详细的观察。

研究表明终末毛细血管间无明显界限,也无静脉瓣。有的牙本质在根管或髓室底有侧副根管,其中的血管可与牙周膜组织相交通。

二、牙髓生长过程中牙髓血管的变化

(一)牙髓血管的基本结构

牙髓血管网在牙根发育完成期最稳定,根据组织学观察,这个时期牙髓血管的基本结构已经形成。

从牙槽动脉分出小动脉,经根尖孔进入牙髓,沿根管上行,至牙髓表层附近分支为动脉性毛细血管,再向牙本质方向延伸,在成牙本质细胞层中呈水平分支,反复吻合,形成毛细血管网,把这称作终末毛细血管网,毛细血管集中后形成静脉毛细血管,在牙髓表层流入细静脉网。动脉以及静脉毛细血管部分,统称之为毛细血管网。从细静脉网出来的静脉,经牙髓中央流入主干静脉,主干静脉从根尖孔出髓腔穿过牙周膜进入牙槽静脉。

牙髓的主干动脉在走行途中有的呈"U"形,在圆弧的部位又有2~3个小分支。经血管铸型法观察认为,在分支的基底部略凹陷,该部位血管内壁可能有括约肌,这是动静脉吻合调节牙髓血流的一个特殊构造。

（二）牙髓生长过程中血管网的变化

牙髓表层的血管网基本上由3层构造所组成，随着牙髓的生长、成熟、老化、病变等变化，其血管网也相应发生各种各样的变化，可分为4个时期进行观察：

1. 牙冠完成期

牙冠的基底部呈敞开状，许多动脉和扩张的静脉从牙冠的基底部侵入牙髓。牙髓表层的血管网的三层构造尚未完成，特别是细静脉网尚未形成。

2. 牙根形成期

在牙根逐渐形成的同时牙齿开始萌出，而此时牙根尖尚未发育完成，根管粗大，血管网密度大，牙本质形成速度快，成牙本质细胞层增厚，毛细血管的厚度也增大，终末毛细血管网在造牙本质细胞之间形成多角形的血管网丛，此阶段细静脉网尚未完全形成。从牙根形成的部分来看，根管部分的血管随着牙根的发育而逐渐形成。

3. 牙根完成期

在牙根发育完成初期，牙髓血管网呈最稳定状态，特别是在牙髓表层能明确区分为三层结构，构成牙髓血管网的基本形态。毛细血管网之间呈平行状态，而与终末毛细血管呈直角关系。牙髓主干动脉从牙髓中央穿行，主干静脉从主干动脉的外侧向根尖孔方向移行。髓腔内的牙髓血管为全封闭状态，仅仅通过根尖与外界相交通。

4. 成熟期

牙根完成期阶段，继发性牙本质形成旺盛，髓腔变窄，其结果牙髓血管网三层结构受到影响，主要变化为毛细血管网厚度减小，随之毛细血管网消失，接着细静脉网也消失，终末毛细血管网出现改建并变粗，从终末毛细血管网出来的血液直接进入主干静脉，而主干静脉本身也吻合集中形成1～2根较粗的主干静脉。

这一时期牙髓血管的主要特征为：毛细血管网和细静脉网减少，甚至消失。牙髓成熟之后逐渐向老化方向转化。这一生理性变化，无论对于牙髓病的临床研究还是对于牙髓病理、生理学研究都是十分重要的。

三、牙髓血管的增龄性变化

牙根发育完成后，随着年龄的增加，牙髓血管网结构也不断地改建，特别是静脉系统变化显著，牙髓组织对于急性炎症的防御功能逐渐减弱，这对于牙髓的生命力有很大的影响。

实验资料表明：露髓后，年轻牙髓常形成溃疡性牙髓炎，由于牙髓活力强，还可以形成增生性牙髓炎，在炎症局部的肉芽组织中有无数的毛细血管交织成网状，在其周围动脉毛细血管和静脉毛细血管之间可有许多吻合，将肉芽组织包绕，这也是牙髓组织对变性炎症的防御结构。

牙髓的急性炎症期，年轻牙髓的防御修复能力强，常常使急性炎症转变成慢性炎症，而老年牙髓在急性炎症期迅速激化，炎症扩散引起组织溶解，甚至牙本质小管内容物也出现溶解，老年牙髓的急性炎症往往在过渡到慢性炎症之前即向牙髓坏死移行。这种变化特点，在临床治疗中应予以充分认识，因为老化的牙髓组织防御修复功能和牙髓活力都较年轻牙髓明显减弱。从组织学观察，牙根发育完成之后牙髓血管网并不是一成不变的，牙髓血管有显著的增龄性变化，即随着年龄增加牙髓血管网也不断改建。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

四、龋洞、制洞与牙髓微循环

由于龋洞、制洞都涉及牙本质，因而对牙髓组织有很强的物理刺激，可引起牙髓表层血管网充血。这种状况轻者可以恢复，重者可发展为浆液性牙髓炎。这是由于牙髓血管受到物理性刺激通透性亢进、血浆成分向血管外渗出所致。这一变化过程用血管铸型法观察，发现制洞后4h，洞底部的血管通透性亢进，注入的树脂从毛细血管中渗漏到血管外，进一步观察，可见牙髓最表层的终末毛细血管网几乎无变化，而树脂是从静脉性毛细血管、细静脉网等系统渗出的。

用扫描电镜观察牙髓静脉内壁，发现由于物理性刺激而导致牙髓炎症，炎症又引起静脉内壁的内皮细胞间隙扩大，从而树脂便从细胞间隙中渗出。

在无喷水冷却的状况下，制备深洞时，牙本质小管内容物被吸出而蒸发，使牙本质小管成为空管。洞附近牙髓表层的终末毛细血管网破裂，牙髓组织的一部分被吸出，从而出现牙髓"流泪现象"。

从微循环动态观察牙髓的特征，牙髓组织容积变化的允许范围与其他组织相比是极低的，这与牙髓组织所处的特殊环境有关。牙髓组织处于牙本质包围之中，因此，在制洞时，牙髓的血流增加、细动脉口径扩大，组织压上升，在血流量增加的同时细静脉的口径也扩增，组织压进一步上升且高于细静脉压时，导致血流缓慢。由于组织压过高压迫血管特别是压迫细静脉，形成牙髓血管的闭塞性血栓，从而导致牙髓组织陷于坏死。

牙髓的生理血流量：每 100 mg 牙髓组织为 40～50 mL/min，这个值作为整体比口腔内任何组织的血流量都高，与脑组织的血流量几乎相同，但是比心脏、肾脏的血流量低(图 5.1)

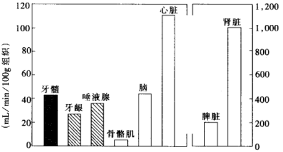


图 5.1　各种脏器、组织血流量比较(每 100g 组织 mL/min)
(引自：下野正基　饭岛国好编集.《治愈の病理》)

在临床实际工作中，无论是制洞，还是制作修复体前的牙体预备，磨削到釉牙本质界的一瞬间，牙髓的血流量上升 53%，即使终止磨削，20min 以后血流量才能恢复正常。然而，在制洞或牙体预备时，如果机头喷水不充分，牙髓的血流量则明显减少，磨削牙本质直到距髓腔仅残存 1mm 厚度时，即使 1h 后测定其牙髓的血流量，仍比正常量减少 10%。产生这种现象的机制可能是：在无喷水或喷水不完全的状态下，磨削牙本质可引起局部牙髓组织炎症，使血管扩张、组织压上升，组织压超过静脉压造成局部血流受阻，从而造成各种代谢产物在组织内滞留导致进一步血管扩张，使组织压增高，形成这样一个恶性循环，最终使牙

髓组织坏死。

通常,牙髓的组织压为6mmHg,全身血压为125mmHg,牙髓血压细动脉为43mmHg,毛细血管为35mmHg,细静脉为19mmHg。在牙髓组织中,从细动脉到细静脉的血压较低,这与其他组织相比也是一个重要的生理特征,也是牙髓组织的血流量比其他一些组织血流量多的原因所在。由于制洞或炎症等刺激,牙髓内的组织压可达到16~20mmHg,此时,牙髓血管的动静脉吻合以及"U"形血管瓣都呈开放状,在根管内上行的支脉血液大部分又直接流入细静脉,由根尖孔流至牙髓外,导致牙髓组织缺血,进一步加剧牙髓组织炎症。

五、炎症与牙髓微循环

通常可将牙髓炎症分为三期。

第一期:血管通透性亢进期。

第二期:炎性细胞浸润期。

第三期:肉芽组织形成和组织修复期。

(一)第一期

血管通透性亢进期又可以分为即时型和迟缓型。即时型——受到刺激30min内血管通透性达到最高,迟缓型——受到刺激数小时后才出现高峰。

由于炎症而引起的血管通透性亢进,可出现静脉内壁细胞间隙增大,血液中的蛋白质等大分子从血管中渗出,这是第一期重要的炎症性血管反应。由于牙髓组织处于被釉质牙本质或牙骨质牙本质包绕的特殊环境,因此,牙髓的血液循环与皮肤和肌肉的血液循环有许多不同之处。

牙髓组织是由自律神经支配的,副肾上腺素能神经较少,几乎都是交感神经支配。感觉神经末梢向组织释放神经肽,可以引起与局部炎症同样的早期血管反应,把这种现象称之为神经源性炎性反应,神经肽中对血管影响最明显的是P物质(substance P)和降钙素基因相关肽(calcitonin gene - related peptide, CGRP),C纤维中含有P物质。已经确认:中枢神经系统中含有丰富的C纤维,牙髓与大脑同样处于被硬组织包绕的特殊环境中,可以较好地防护外来刺激,同时也决定了牙髓循环的特殊性。当牙髓组织受到炎性物质等刺激,血管通透性亢进和浸出液增加时,被外周的硬组织限制而不能肿胀,因此髓腔组织受压增大,使静脉血流受阻。

由于牙髓组织被硬组织包绕,从而也使常规方法难以测定牙髓微循环,有学者报告:采用在牙体硬组织上开窗的方式,可以动态观察牙髓组织以及牙髓血管、微循环等。

牙髓组织受到炎症刺激后产生两种反应:①局部产生化学介质;②神经纤维分泌神经肽。炎症初期,牙髓血管的体积只扩大10%~12%,与此相对应血流量也只能增加50%,而实际上血流速度却增加了100%~200%,这是由于牙髓动脉收缩所致。因此,牙髓充血的本质是血流速度加快,而不是血流量增加,血流速度加快可促使致炎物质等通过血流迅速扩散。

牙髓组织炎症时髓腔内压增大,毛细血管对血浆渗出液有一定吸收能力,这在某种程度上也可以对牙髓内压起一定的调节作用。然而,这种调节作用是十分有限的。髓腔内压过大,压迫血管引起血流减少,血栓形成,引起牙髓组织不可逆损伤,进一步发展,血栓可导致血流受阻,结果使牙髓组织陷于坏死。年轻恒牙的牙髓在炎症局部形成溃疡,以后在其

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

周围形成炎性肉芽组织包绕，可防止炎症扩散。而老化的牙髓，从炎症期至坏死期时间非常短暂，这也意味着年龄增加生命力逐渐减弱。

（二）第二期

随着血管通透性增加，炎症进一步加剧发展为第二期，由于化学介质等刺激细静脉的内皮细胞间隙加大，多核白细胞、淋巴细胞、巨噬细胞等向炎症区域聚集、浸润。

（三）第三期

炎症发展至第三期为肉芽形成和组织修复时期。作为牙髓组织的修复，理想的状态为形成修复性牙本质以阻断与外界的联系。对于炎症，血管反应几乎都是静脉系统的反应，血管反应也可以认为是组织的一种防御机制。年轻恒牙牙髓的炎症局部肉芽组织形成，外围由血管网和纤维结缔组织包绕使炎症局限，而老年患者的牙髓由于组织防御机能也随之老化，修复能力很弱甚至几乎丧失。

第二节　牙髓钙化性修复生理

在发生学上，机体中由间叶系统而来的硬组织有骨、软骨、釉质、牙本质、牙骨质。而这些硬组织是从特殊的纤维结缔组织骨膜、骨髓、软骨膜、牙髓、牙周膜的细胞中分化形成的。

牙髓来自外胚间充质的牙乳头，充满于髓腔内，是一种特殊类型的结缔组织，含有细胞、细胞间质、血管、神经和淋巴等。

一、牙本质－牙髓复合体

通常组织受到创伤而缺损时，便会引起组织修复再生。在以纤维性修复为主的情况下，首先形成肉芽组织，接着缺损部位的结缔组织细胞活化，纤维母细胞分裂增殖，形成细胞间胶原纤维，同时有许多毛细血管新生，最终形成瘢痕组织，以修复缺损的部位。

牙髓受到创伤时，其修复再生的形成并非形成瘢痕组织，而是形成钙化的牙本质，即修复性牙本质。由于牙髓与牙本质之间有着不可分割的联系，因此将牙髓与牙本质视为一个器官或复合体的理论是牙体修复生物学基础的理论根据，对临床具有重要的指导意义。

二、牙髓细胞分化的特殊性

牙髓细胞实为成纤维细胞，细胞的胞体多为星形或梭形，中央有一卵圆形的胞核，周围有胞浆突起，相互连接，呈星网状。冠部牙髓由外向内分为成牙本质细胞层、乏细胞层、多细胞层、牙髓。乏细胞层位于冠髓成牙本质细胞层内侧，该层细胞数少而且很薄，在牙颈部和牙根部该层不明显。多细胞层中细胞密集，并且碱性磷酸酶活性很强。多细胞层中某些细胞具有形成硬组织的潜在功能，可作为成牙本质细胞的储备细胞，当受到某种刺激时可以分化为成牙本质细胞。

直接盖髓术或间接盖髓术后，多细胞层的细胞可分化为成牙本质细胞，形成修复性牙本质。

切髓术后，由于多细胞层被去除，因此只能依靠牙髓细胞来完成修复的使命。用狗进行动物实验观察到，从牙髓细胞增殖到分化为成牙本质细胞大约需 14 d；而用无菌大鼠为实验对象，同样进行切髓术，观察到从牙髓细胞增殖到分化为成牙本质细胞仅需 3 d，第 5 d

可见牙本质形成。

三、修复性牙本质和牙本质桥

牙本质主要由钙化基质和成牙本质细胞突起构成，为牙齿的主体，形成牙齿的不同形态，即使去除其冠部表面的釉质和根部表面的牙骨质，仍能区分不同的牙别。

牙本质呈淡黄色，有光泽，其硬度仅次于釉质，居身体各组织硬度的第二位。无机成分约占 70%，主要为羟磷灰石，有机物约占 20%，主要是胶原蛋白，其他还有柠檬酸、不溶性蛋白、黏多糖和脂类。

在生理条件下形成的牙本质可分为：

1. 罩牙本质，这是指紧靠釉牙本质界的狭窄的外周牙本质，该部分牙本质由内釉上皮诱导分化的成牙本质细胞所形成，其厚度约 20μm，其中含有粗大的胶原纤维束，它的排列与牙本质表层垂直，钙化较低并且均匀。

2. 原发性牙本质，指在罩牙本质形成之后，直到牙根发育完成时形成的牙本质。

3. 继发性牙本质，指在牙根发育完成之后，随着年龄增长而不断形成的牙本质。

在病理条件下形成的牙本质可分为：

1. 修复性牙本质。

牙髓对于牙齿受到刺激、破坏时，均能作出明显反应并进行特殊修复，即生成修复性牙本质。

修复性牙本质是在受到磨损、酸蚀、龋病等刺激后，在髓腔壁相应的部位形成的牙本质，它往往突向髓腔。这部分的牙本质中牙本质小管稀少、弯曲，排列紊乱，钙化也不均匀。它可以补偿外部组织的缺损，增加髓腔与外界的距离。

修复性牙本质形成的机制，简而言之，当牙髓受到刺激后，一方面牙髓组织水肿、嗜中性白细胞浸润，成牙本质细胞受损后萎缩、消失；另一方面修复性变化表现为细胞置换，即多细胞层中未分化间充质细胞分化、增殖，形成新的成牙本质细胞。如果多细胞层也受到损伤时，其下方牙髓细胞便分化、增殖，形成成牙本质细胞。

形成修复性牙本质的速度，大鼠为 5～6 μm/d，猴为 4 μm/d，而人平均为 1.5μm/d。对于人来说，牙髓受到损害后，从未分化的间充质细胞分化为成牙本质细胞到产生牙本质基质约需要 20 d，形成 0.1mm 厚度的修复性牙本质约需 3 个月，形成 1mm 厚度的修复性牙本质约需要 2 年。

2. 牙本质桥：指在直接盖髓或切髓术后，在牙髓断面形成的牙本质。

牙本质桥形成机制与修复性牙本质形成机制类似。活髓切断后的创面用氢氧化钙覆盖，表层牙髓组织出现坏死，接着经过渗出期、增殖期到骨样牙本质期，最后形成牙本质桥，修复牙髓切断面。

牙本质桥起源于新生的成牙本质细胞，牙髓切断后深部的牙髓细胞向牙髓断面坏死层游走，分化为成牙本质细胞，形成牙本质桥。

影响牙髓组织形成牙本质桥的因素主要有细菌、外部压力等。用无菌饲养大鼠的磨牙进行部分露髓和全部露髓实验，观察外部压力对牙本质桥形成的影响，术后食用固形饲料组，露髓创面无一例形成牙本质桥；而术后食用灭菌牛奶饲养组则发现部分露髓创面，术后第 3 d 形成新生成牙本质细胞，术后第 5 d 形成牙本质桥。全部露髓创面，术后第 3 d 可见

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

末分化间充质细胞增殖和类骨组织形成，第 7 d 形成骨样牙本质，但是，直到术后第 21 d 也未发现牙本质桥中有牙本质小管样结构。

由此可见，牙髓细胞仅用 3 d 就可分化成成牙本质细胞，在牙髓细胞分化成成牙本质细胞形成牙本质的过程中，细菌和外部压力是重要的影响因素。此外，局部的微环境以及局部是否存在特定的牙本质诱导因子等因素，也有一定的影响。

四、牙髓的钙化能力

狭义而言，机体中无上皮覆盖的唯一部位是牙齿。可是，广义而言，将由外胚叶发生的釉质看成是附着上皮的连续，则机体中无上皮覆盖的部位是不存在的。上皮覆盖着机体表面以保护机体免受外来损伤，上皮下结缔组织（中胚叶、牙髓等）是机体重要的防护壁（层）。

牙髓是具有钙化能力的结缔组织，当受到龋病等刺激后，牙髓细胞分化成成牙本质细胞，可形成新的牙本质，以保护其自身。

（朱天龄，王景杰）

参考文献

1. Wellings AW. Some points in the anatomy of the capillary of the tooth pulp . Proceedings of the Royal Society of Medicine , Section on Odontology. 1925;19: 27
2. Kramer IRH. A technique for the injection of blood vessels in dental using extracted teeth , Anat . Rec. 1951; 111:91
3. Prvenza DV. The blood vascular supply of the dental pulp with emphasis on capillary circulation , Anat. Res. 1958;6:213
4. Kindlova M, Metena V. Blood circulation in the rodent teeth of the rat , Actaanat. 1959;37:177
5. 徐藤敏一.口腔及び其の周围组织に於ける微细血管分布について. 齿牙及び齿周组织. 广岛医学. 1959;1:550
6. Kramer IRH. The vascular architecture of the human dental pulp, Arch . oral Biol. 1960;12:177
7. 蒲宣雄. 合成树脂铸型法による 齿牙の血管系の立体的研究. 岐阜医科大纪要. 1961;9:160
8. 蒲宣雄.合成树脂铸型法による 齿牙の血管系の立体的研究. 岐阜医科大纪要. 1961; 9:160
9. 林秀男.炎症，その发生と抑制の机制について. 日病会志. 1967. 56:37
10. Kramer IRH. The distribution of blood vessels in the human dental pulp. In Finn, S. B,. ed . Biology of the dental pulp organ : A Symposium. University Alabama, Univerity of Alabama Press. 1968.
11. 田崎严、吉永秀、林秀男.血管透过机制－その形态学と生化学. 蛋白质核酸酸素. 1969;14:1336
12. 三好万佐行、水谷俊雄、饭冢敦夫.内皮细胞质を通る颗粒白血球の游走－マウス胆囊血管での电显的观察一. 解剖学杂志. 1970. 45:217
13. 松谷道夫.标准抗体法による 齿牙龋蚀症の病理学的研究－とくに龋蚀象牙质における 唾液成分と微生物の局在性について一.齿基础志. 1971; 13:544
14. 山田英智.血管内皮の制造と机能. 血液と脉管. 1972. 3:511
15. 小柴宏明.乳齿齿髓毛细血管に关する电子显微镜的观察. 齿基础杂志. 1973; 15:116
16. 神原武.炎症における脉管系の役割. Ⅰ形态；山村雄一，林秀男. 炎症学 书Ⅰ. 炎症反应（1版）. 医学书院. 东京，1976. 39
17. 吉永秀.炎症における脉管系の役割. Ⅱ机能；山村雄一，林秀男. 炎症学 书Ⅰ. 炎症反应（1版），医学书院. 东京，1976. 61
18. 川钦一郎.炎症と结合组织Ⅰ. 超微形态学の立场から；山村雄一，林秀男，炎症学 书Ⅰ. 炎症反

应(1 版),医学书院. 东京, 1976. 206
19. 市川澈. 犬における 生活齿髓切断后のDentin Bridg 形成に关する光显的ならびに电显的研究. 齿科学报. 1976, 76:391
20. 岸好彰,高桥和人,横地千仞,伊藤春生. 口腔黏膜における 毛细血管の立体的观察, Ⅱ, 舌における 动静脉吻合について. 齿科基础医学会杂志. 1976;18:171
21. 岸好彰,高桥和人. 口腔黏膜における毛细血管の立体的观察, Ⅲ, 齿根膜について. 齿科基础医学会杂志. 1977;19:192
22. 陈启华. 生活齿髓切断后. 齿髓の创伤治愈における 齿髓细胞の分化と诱导. 齿科学报. 1978. 78:287
23. 岸好彰. 血管铸型法と走查型电显による 内缘上皮直下の血管网の推移について. 齿科基础医学会杂志. 1982;24:706
24. 饭岛宗一. 炎症の概念と感染症. 病态生理. 1983. 2:547
25. 高桥和人. 齿髓血管网の立体的观察. 日本齿内疗法协会杂志. 1984;5:1
26. 藤田尚男、藤田恒夫. 标准组织学 – 各论 –(2 版). 医学书院. 东京. 1984: 1
27. A. ファイアン, 中枢神经系での移植:前田哲司. サイエンス. 日经サイエンス. 东京. 1986: 30
28. 高桥和人. 血管系から见た齿髓の生命力. ザ. クインテッセンス. 1987; 6:23
29. 史俊南、韩桃娟主编. 口腔内科学(教材). 西安:第四军医大学. 1987
30. 陆先锟主编. 口腔组织病理学(教材). 第 2 版. 西安:第四军医大学. 1987
31. 早川太郎、须田立雄. 齿髓とその病态. 医齿药出版, 东京, 1987, 237
32. 小林正美. 走查电显と血管铸型法による イヌ齿髓の血管 . 神奈川齿学. 1988; 318:173
33. 竹居孝二. テット切齿齿髓の象牙质形成能に关する实验的研究. 齿科学报. 1988, 88:943
34. 下野正基、山村武夫. 齿髓修复のメカニブム. 治愈の病理(下野正基, 饭岛国好编). 医齿乐出版, 东京. 1988, 162
35. Seltzer S and Bender IB(户田忠夫监修)齿髓 – 临床における 生物学的考察. 医齿药出版. 东京, 1988, 1 ~ 106. 295
36. 陈盛辉. In vitro における齿髓, 齿根膜および骨髓细胞の骨形成能に关する研究. 齿科学报. 1991, 91:37
37. 井上孝、陈盛辉、下野正基. テット齿髓, 齿根膜, 骨髓细胞の骨形成能ならびに软骨诱导に关する研究. 齿科基础社. 1991. 33:16
38. 高桥和人. 齿髓の微小循环. 日本齿科医学杂志. 1992;3 (31):106
39. 下野正基. 修复象牙质の形成. 日本齿科医学会社. 1992. 11:111
40. 井上孝、齿原性. 口腔外科. 病理诊断アトテス(下野正基,野间弘康, 山根源之编), 医齿药出版. 东京, 1992, 150
41. 井上孝. 象牙芽细胞の分化. 日本齿科医学会社, 1992. 11:144
42. 下野正基. 修复性牙本质的形成. 日本齿科医学会社. 1992. 3(31):111
43. 高桥和人、岸好彰. 窝洞齿冠形成和牙髓的血液动态. 治愈の病理. 临床编. 第 1 卷. 齿内疗法. 224. 医齿莱出版株式会社. 1993. 东京
44. 王光华、彭式锟. 牙体修复学. 北京:人民卫生出版社. 1994, 13
45. 史俊南主编. 现代口腔内科学. 北京:高等教育出版社. 2000

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书, 微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

第六章　牙髓生物化学

牙髓作为一种特殊的结缔组织,其组成成分包括各种类型的牙髓组织细胞和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)。细胞外基质是由牙髓成纤维细胞和成牙本质细胞等合成并分泌到细胞外的生物大分子所构成的网络状物质,分布于细胞之间或细胞表面。根据细胞外基质的分子组成,可将其分为糖蛋白和蛋白多糖,前者包括胶原、纤维黏连蛋白、层黏连蛋白、硫酸软骨素、肝素、透明质酸、硫酸角质素等,后者包括核心蛋白和若干氨基多糖侧链组成的大分子。纤维黏连蛋白、层黏连蛋白等又称非胶原糖蛋白。牙髓的功能在于产生和维持牙本质,其丰富的血管系统对包括成牙本质细胞在内的牙髓细胞起着供给营养的作用。细胞外基质是牙髓中各类细胞生存的外环境,也是牙髓组织和牙本质的主要构成部分,它对牙髓细胞和组织的生物学效应包括影响细胞的形态、控制细胞的迁移、调控细胞的增殖、诱导细胞的分化、影响免疫细胞的功能、参与钙化过程等。其化学成分的动态变化是一个窗口,通过它可以窥测牙髓细胞的代谢活性和功能。

第一节　胶原蛋白

一、胶原蛋白的结构和分类

胶原蛋白简称胶原，属于纤维状蛋白，其分子单位称为原胶原(tropocollagen),为避免与后述的前胶原(procollagen)相混淆，可称其为胶原单位。若干个胶原单位重叠并列构成胶原微纤维，显微镜下见到的胶原纤维即由大量胶原微纤维构成。一个胶原单位通常由三条α肽链相互缠绕形成右手螺旋(图6.1)。每条α肽链本身也盘绕成螺旋，其分子长度一

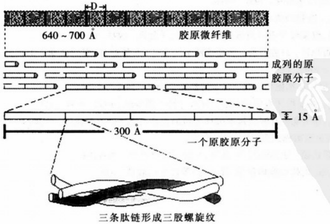


图 6.1　胶原结构示意图

般可达 300 nm，直径约 1.5 nm。每条 α 肽链大约由 1 000 个左右的氨基酸残基构成，所以原胶原的分子量很大，约为 300 kD。

α 肽链的一级结构（氨基酸序列）有以下几个特点：

1. 氨基酸序列中呈规律性地每隔两个氨基酸即出现一个甘氨酸（Gly），所以甘氨酸的数量多达 1/3，α 肽链的序列基本上可以用 $(Gly-X-Y)_n$ 表示。

2. 含有许多在其他蛋白质中很少见的羟脯氨酸和羟赖氨酸残基，脯氨酸和赖氨酸残基亦较丰富。

3. 缺乏色氨酸。

传统上以为胶原纤维只是赋予牙髓组织抗张力，分子生物学研究表明：胶原纤维和其他间质成分还对基质沉着、细胞增殖、移动、形态发生以及细胞行为的调控起一定作用。

由于 α 肽链的种类不同，因此胶原蛋白被分成各种类型（表 6.1）。

表 6.1　胶原的分子类型

胶原	肽链	分子排列	分布
Ⅰ型	α1(Ⅰ)	[α1(Ⅰ)]$_2$α2(Ⅰ)	多数组织，除外软骨
	α2(Ⅰ)		
Ⅱ型	α1(Ⅱ)	[α1(Ⅱ)]$_3$	软骨组织
Ⅲ型	α1(Ⅲ)	[α1(Ⅲ)]$_3$	常与Ⅰ型胶原共存，尤其是在血管、皮肤和牙髓
Ⅳ型	α1(Ⅳ)	[α1(Ⅳ)]$_2$α2(Ⅳ)	基底膜板（基片）
	α2(Ⅳ)	[α1(Ⅳ)]$_3$或[α2(Ⅳ)]$_3$	
Ⅴ型	α1(Ⅴ)	[α1(Ⅴ)]$_3$，[α1(Ⅴ)]$_2$α2(Ⅴ)	多数组织，除外软骨
	α2(Ⅴ)	或 α1(Ⅴ)α2(Ⅴ)α3(Ⅴ)	
	α3(Ⅴ)		
Ⅵ型	α1(Ⅵ)	α1(Ⅵ)α2(Ⅵ)α3(Ⅵ)	多数组织
	α2(Ⅵ)		
	α3(Ⅵ)		
Ⅶ型	α1(Ⅶ)	[α1(Ⅶ)]$_3$	可能是锚定微纤维蛋白
Ⅷ型	α1(Ⅷ)	[α1(Ⅷ)]$_3$	Descement 膜（角膜后弹性层）
Ⅸ型	α1(Ⅸ)		
	α2(Ⅸ)	α1(Ⅸ)α2(Ⅸ)α3(Ⅸ)	软骨
	α3(Ⅸ)		
Ⅹ型	α1(Ⅹ)	[α1(Ⅹ)]$_3$	肥大软骨细胞
Ⅺ型	α1(Ⅺ)		
	α2(Ⅺ)	α1(Ⅺ)α2(Ⅺ)α3(Ⅺ)	软骨
	α3(Ⅺ)		

Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型胶原为主要的间质胶原（major interstitial collagens），其中Ⅰ型胶原为异质三聚体（heterotrimers），Ⅱ型和Ⅲ型胶原为同质三聚体（homotrimers）。然而，在皮肤和牙髓中曾检测到同质三聚体形式的Ⅰ型胶原，称为Ⅰ型三聚体（type Ⅰ "trimer"），尚不清楚它与异质三聚体的Ⅰ型胶原在性质和功能上有何差异。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

二、胶原的来源和作用

(一)胶原的来源

最初认为只有纤维细胞可以产生胶原,即在纤维细胞的细胞质粗面内质网上合成的胶原分子,利用细胞内膜系统进行运输,将胶原分子排出质膜,进入细胞外空间,或是通过释放原胶原分子到细胞外,然后在那里聚合为胶原纤维。后来发现基板(basal lamina)下面的成纤维细胞有发育完好的内质网,可以合成分化胶原。继而证明其他类型细胞,如成牙本质细胞、神经上皮细胞、角膜上皮细胞、软骨细胞等也合成和分泌胶原物质。

(二)胶原的作用

1. 作为细胞间相互作用的支架,并作为迁移细胞的附着基质,还可指导细胞的迁移。

2. 刺激上皮分化,维持上皮生长。

多数情况下,胶原并不是单独存在而起作用的,它是与层黏连蛋白、纤维黏连蛋白、氨基多糖等相联形成一种复合物形式协同发生作用的。这些作用是通过胶原与其细胞膜受体的相互作用,影响细胞骨架而引起的。

三、牙髓组织中的胶原

牙髓中胶原含量常因种属而不同,同一种属又因牙髓的不同区域其含量也有很大差别。据 Van Amerongen JP, Lemmens GLG, Tonino GJ 等(1983)报道:人牙髓中胶原含量约占牙髓干重的 32%。至于牙髓胶原的类型,主要以Ⅰ型和Ⅲ型为主,特别是Ⅲ型胶原的含量很高,可达 40%以上。

Ⅰ型胶原在前期牙本质分布密度较高,其纤维粗大,原位杂交和免疫组化均表明成牙本质细胞合成和分泌Ⅰ型胶原,它形成前期牙本质和牙本质的网架。

Ⅲ型胶原是胚胎时期最早出现的胶原之一,前期成牙本质细胞和间质细胞分泌合成Ⅲ型胶原。在牙髓中Ⅲ型胶原呈网状分布,分布密度较高,其中成牙本质细胞层、乏细胞层和多细胞层中的Ⅲ型胶原分布密集,牙髓中央区的神经血管周围沉积较多,前期牙本质内可见细丝状排列,牙本质中也有少量分布。

Ⅲ型胶原在组织中常与Ⅰ型胶原共存,但二者的含量比例却随不同组织而异。目前虽然还未完全弄清各型胶原的物理性质和组织功能,然而Ⅲ型胶原可能与组织的伸展力有关。已知牙髓间质中缺少弹力蛋白(elastin),高含量的Ⅲ型胶原或许正好能补偿因之而缺乏的弹性,使牙髓得以顶住压缩力(compressive forces)。另外,Ⅲ型胶原还与机体组织和细胞的分化、成熟和损伤修复等密切相关。牙髓中Ⅲ型胶原的分布与纤维黏连蛋白(Fn)的分布有密切关系,有 Fn 存在的部位都有Ⅲ型胶原存在。Van Amerongen JP, Lemmens IG, Tonino GJ,(1984)、Karjalainen S, Soderling E, Peuiniomi L 等(1986)指出:牙髓中的 Fn 可随Ⅲ型胶原的出现而出现,随其变动而变动,Fn 与Ⅲ型胶原的结合胜过与其他胶原的结合。由于Ⅲ型胶原和 Fn 分布的一致性,以及与 Fn 的结合力,无疑对牙髓愈合能力起了有效的保障作用。许多研究表明:牙髓中Ⅲ型胶原的含量随年龄而增加,类似情况亦见于皮肤和项韧带。

除了Ⅰ型、Ⅰ型三聚体和Ⅲ型胶原外,在牙髓组织中还可检测到少量的Ⅳ、Ⅴ型和Ⅵ型胶原。Ⅳ型胶原主要分布在牙髓血管的基底膜,Ⅴ型和Ⅵ型胶原构成一个微纤维网络散布

于牙髓基质中，这些纤维包绕在血管周围，在成牙本质细胞层下变得更为丰富。另外，在完全分化的成牙本质细胞和前期牙本质之间也发现了呈螺旋状的Ⅵ型胶原。

四、胶原的合成和分解

原胶原基因跨度约 38kb，含 52 个外显子，所以转录后的剪接非常复杂多样。原胶原 mRNA 的翻译在粗面内质网（RER）进行，新生肽链经过羟化、糖基化、切除信号肽段等修饰后成为可溶性的前胶原（procollagen），再经高尔基体分泌至细胞外。存在于细胞外液中的内切肽酶能使前胶原水解，去掉其两端约 30% ~ 40% 的肽段，并且自动聚合成胶原微纤维。此种借分子间各部分不同电荷相互吸引而形成的胶原微纤维不稳定，韧性也差。细胞外液中的赖氨酰氧化酶（属单胺氧化酶，MAO）能催化 α 肽链中的赖氨酸残基或羟赖氨酸残基氧化，所产生的醛基可与另一 α 肽链中的类似醛基进行醇醛缩合反应，或者与邻近的氨基进行醛胺缩合反应，形成稳定的共价键，此过程称为原胶原分子的共价交联（cross linking）（图 6.2）。

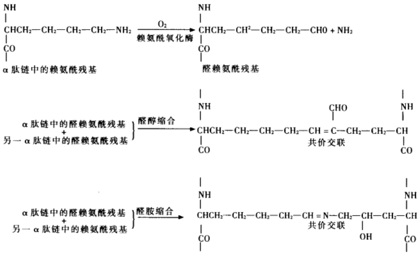


图 6.2　原胶原分子的共价交联

通过分子间共价交联，胶原微纤维的张力加强，韧性增大，而溶解性明显降低，最终形成不溶于弱酸的成熟的胶原纤维。由此可见，胶原纤维的稳定性取决于共价交联，它受赖氨酰氧化酶活性的影响。此酶含 Cu^{2+}，如果体内缺铜或长期服用排铜药物（例如青霉胺），则酶活性将因此受抑制而影响胶原纤维的成熟，致使结缔组织韧性减弱，伤口愈合延迟。

实验证明：分离的牙髓细胞能够合成以Ⅰ型和Ⅲ型为主的胶原蛋白；成牙本质细胞合成和分泌Ⅰ型胶原、Ⅰ型三聚体和Ⅴ型胶原，不分泌Ⅲ型胶原；前期成牙本质细胞和间质细胞合成和分泌Ⅲ型胶原。

胶原蛋白的降解主要靠细胞外液中胶原酶的作用，只有当原胶原分子受胶原酶的作用，于离 N 末端 3/4 处断裂成较小片段并自动变性后，才可被非特异的蛋白酶和肽酶作用而水解。Ca^{2+} 是胶原酶的激活剂，血清中 α^{2-} 巨球蛋白能与胶原酶结合而抑制其活性，从

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

而调节胶原的分解。胶原酶对温度特别敏感，36℃时的酶活性比30℃时大10倍。炎症组织的局部温度升高，可能因此加速胶原的分解。胶原分解后产生的寡肽或游离氨基酸中都含有羟脯氨酸，它可作为反映胶原降解程度的一项指标。

糖皮质激素对胶原蛋白的合成和分解代谢都有影响。它阻抑羟化酶，抑制前胶原的合成；同时又诱导胶原酶的生成，促进胶原分解。因此，长期使用糖皮质激素类药物可致胶原纤维减少、皮肤变薄、骨质疏松以及延缓创伤愈合等副作用。

各种类型的细胞在生理和病理条件下可分泌胶原酶。口腔组织中的胶原酶首先是在人牙龈组织培养液中被证实的。由于胶原组织破坏是牙周病的一个主要病理特征，所以提出胶原酶可能在此病中起一定作用。已知病变处的一些微生物可产生细菌胶原酶，但并非牙周胶原降解的主要原因。不管健康的或是炎症的牙龈组织培养中都显示大量的组织胶原酶活性。越来越多的事实表明：组织胶原酶才是牙周病时胶原破坏的主要因素。虽然有关牙髓中胶原代谢的研究不如牙周组织多，但实验证明牙髓胶原的降解也是由组织胶原酶介导的。已经从牛牙髓组织的无血清培养液和人的炎性牙髓中检出胶原酶，然而其细胞来源尚未确定。Kishi J，Kawai T，Hayakawa T等(1985)证实从牛牙髓分离的成纤维细胞样细胞(fibroblast like cells)能够合成有潜在活性的胶原酶，同年Sakamoto S，Baird SA，Sakamoto M又报道从兔牙髓细胞克隆来的成牙本质细胞样细胞(odontoblast like cells)能高水平地合成胶原酶。

除能合成胶原酶外，各种组织细胞同时还能合成胶原酶的抑制物。体外和体内胶原酶活性的调节可能均涉及胶原酶抑制物。实际上，在牙髓组织和从牛牙髓分离的成纤维细胞样细胞培养液中，发现胶原酶的同时也发现了其抑制物。值得一提的是成牙本质细胞，它的功能是在牙本质生成(dentinogenesis)方面，却又合成和分泌胶原酶，岂不自相矛盾？但联想到骨组织胶原酶的细胞来源不是破骨细胞(osteoclast)，而是成骨细胞(osteoblast)，也就不足为奇了。因此可以认为成牙本质细胞不仅在胶原的合成，而且还在胶原的分解中起一定作用。

胶原及其降解片段具有对单核细胞的趋化活性，提示胶原的降解可引起牙髓组织中炎细胞的浸润。因此，龋病和继发的感染所致牙髓组织中胶原酶活性增加，促进胶原的降解可能与龋病的病理有关。

第二节　蛋白多糖

蛋白多糖(proteoglycan)或称蛋白聚糖，是结缔组织中细胞外基质的重要组成成分，它由大量糖胺聚糖(glycosaminoglycan)链与一个蛋白核心(protein core)，即一条肽链连接构成。糖胺聚糖属杂多糖类，其组成成分中均含氨基己糖(己糖胺)，所以又称氨基多糖。正常情况下，糖胺聚糖链在体内并不游离存在，而是与肽链结合成蛋白多糖形式。组织化学观察和生物化学分析表明：牙髓糖胺聚糖在牙本质生成过程中起重要作用。人体组织内常见的糖胺聚糖有透明质酸(hyaluronic acid)、硫酸-4-软骨素(chondroitin-4-sulfate)、硫酸-6-软骨素(chondroitin-6-sulfate)、硫酸角质素(keratan sulfate)、硫酸皮肤素(dermatan sulfate)和肝素(heparin)等。牙髓中以硫酸-4-软骨素、硫酸皮肤素和硫酸角质素为主，还有少量透明质酸(图6.3)。

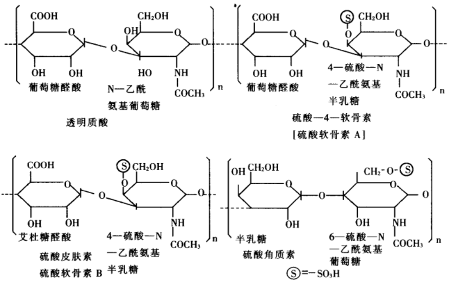


图 6.3　牙髓中几种糖胺聚糖的结构

糖胺聚糖分子结构有以下特点：

1. 它们都是重复二糖单位的长链，二糖单位的数目(结构式中的 n)很大，可达 500 以上，所以糖胺聚糖的分子量是很大的。

2. 构成二糖单位的单糖均为己糖及其衍生物，有葡萄糖醛酸、艾杜糖醛酸、半乳糖、N－乙酰氨基葡萄糖和 N－乙酰氨基半乳糖等。

3. 除透明质酸外均含硫酸基。由于糖胺聚糖分子大而具有黏性，又含许多酸性基团，所以又称为酸性黏多糖。

4. 分子内的主要化学键是糖苷键和硫酸酯键，所以催化糖胺聚糖分解的酶主要是糖苷酶和硫酸酯酶。

糖胺聚糖中硫酸软骨素有很强的结合钙的能力，硫酸皮肤素在胶原纤维形成(collagen fibrillogenesis)过程中起重要作用，透明质酸、硫酸软骨素和硫酸皮肤素等多价阴离子能使组织保持水分，尤其是透明质酸保持水分的能力特强，可使牙髓组织的水含量高达 88%。这些作用再加上胶原的作用就形成了对牙髓组织压缩的保护。至于硫酸角质素，它在牙髓中的含量很高，但无特异性，因为在其他结缔组织中它的含量也很高。鉴于硫酸角质素分子中不含糖醛酸，而代之以半乳糖，因此常规的糖胺聚糖测定中仅以糖醛酸来反映其含量就欠妥了，应当用糖醛酸加半乳糖来反映。

作为细胞间质的主要成分，蛋白多糖遍布于全身各组织且含量丰富，它们不仅具有结构上的意义，而且由于能结合许多生长因子和细胞因子并防止其降解，例如成纤维细胞生长因子、转化生长因子、血小板因子Ⅳ等，所以它们还是生长因子和细胞因子活性的调节剂(modulators)。

蛋白多糖中关于糖胺聚糖在不同组织包括牙髓组织中的定性和定量研究较多，而对核心蛋白的研究较少。前已述及，糖胺聚糖在体内是与核心蛋白结合成蛋白多糖而存在的。从量上看，在蛋白多糖分子中糖胺聚糖约占 80%～90%，核心蛋白虽然含量少却对糖

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

胺聚糖的合成至关重要，也是影响牙本质生成的重要因素，已知牙本质生成能力的下降总是伴随着牙髓中糖胺聚糖含量的减少。为什么核心蛋白如此重要呢？原来糖胺聚糖并不是先合成好了再与核心蛋白结合，而是在核心蛋白的肽链上，构成糖胺聚糖的单糖类和糖醛酸等成分一个一个地按顺序连接上去的(图 6.4)：

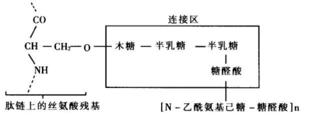


图 6.4 糖胺聚糖链与肽链的连接

由此看来，核心蛋白是糖胺聚糖合成的基础。连接糖胺聚糖链与核心蛋白的化学键大多为 O－糖苷键，即连接在肽链的丝氨酸残基或苏氨酸残基(均含羟基)上。然而，分析牙髓和牙周韧带的糖胺聚糖时，发现含量最多的硫酸角质素却是与肽链上的天门冬酰胺残基通过 N－糖苷键连接的。以 N－糖苷键连接的糖链的合成要比上述 O－糖苷化的过程(图 6.4)复杂。

第三节 非胶原糖蛋白

与蛋白多糖相对应，糖蛋白一般指含糖量较少、糖链较短的蛋白质。胶原蛋白也含少量糖(约 1%)，所以它也是一种糖蛋白。糖蛋白在体内广泛分布于各种组织，结缔组织中的糖蛋白无论在细胞的形态结构上或分化调节上都有重要的功能。除胶原外，结缔组织中尚存在着多种非胶原糖蛋白(noncollagenous glycoproteins)。牙髓中的非胶原糖蛋白主要有纤维黏连蛋白、层黏连蛋白和体外结合素等。

一、纤维黏连蛋白

(一)纤维黏连蛋白的组成

纤维黏连蛋白(fibronectin, Fn)是细胞外液和结缔组织中具有黏连功能的糖蛋白二聚体或多聚体，单体由约 2 000 个氨基酸残基构成，含糖量约 5%，分子量 220～250kDa。

纤维黏连蛋白可分为可溶性的和不溶性的，前者存在于血浆中，称为血浆纤维黏连蛋白，由肝细胞和内皮细胞合成；后者存在于基底膜和组织细胞表面，称为组织纤维黏连蛋白，可由不同类型细胞合成，包括成纤维细胞、星状胶质细胞、早期间充质细胞、巨噬细胞、肥大细胞和培养的上皮细胞等，以不溶的形式沉积于细胞表面、细胞外基质、细胞间隙、基膜和结缔组织中，可使细胞发生黏连并建成组织。两种纤维黏连蛋白性质虽不同，其单体的结构却基本相似。血浆纤维黏连蛋白是由 a、b 两条结构相似的肽链(a 链略长)构成的二聚体，两条肽链通过羧基端的双硫键结合；组织纤维黏连蛋白为多聚体，是在细胞表面形成的，呈微纤维(microfibril)状，微纤维中的纤维黏连蛋白可以来自外来的(向组织培养中加入的)血浆纤维黏连蛋白，也可以来自细胞自身合成并分泌到胞外的纤维黏连蛋白。一般认为可溶性的纤维黏连蛋白通过与细胞表面的受体结合成复合物，而后转变成不溶性的基

质纤维黏连蛋白(matrix fibronectin),后一过程是不可逆的,即可溶性纤维黏连蛋白 + 受体 ⇌ 纤维黏连蛋白 - 受体复合物 → 不溶性基质纤维黏连蛋白,不溶性基质纤维黏连蛋白亦呈微纤维形式,它好像是一个临时的框架,随后被成熟胶原纤维网所取代。

(二)纤维黏连蛋白的生理功能

1. 介导细胞间和细胞与基质的黏连。这是 Fn 的主要生理功能。

Fn 与细胞之间有四个结合位点:

第一个结合位点是含有精氨酸 - 甘氨酸 - 天冬氨酸 - 丝氨酸(Arg - Gly - Asp - Ser, RGDS)的多肽,RGDS 在 Fn 的序列中只出现一次。此多肽对成纤维细胞的亲和性低,它促使黏连的活性比完整的 Fn 弱。

第二个结合位点是在 Fn 分子的 N 端,距 RGDS 约有 300 个氨基酸,此位点的黏连能力也低,但在和 RGDS 的协同作用下,则可产生紧密的细胞黏连。

其余两个位点都在ⅢCS 段,一个位于 Fn 的 C 端,另一个位于ⅢCS 的 N 端,它们都可介导细胞的黏连。由于这些多结合位点,使 Fn 在细胞与细胞、细胞与基质的黏连中发挥其生物学效应。

发生黏连的机制可能是:Fn 分子二肽链上的细胞结合位点都各自与一个细胞表面受体结合,导致两个细胞连在一起。细胞和胶原的联结,可能是由于 Fn 上细胞结合位点和细胞表面受体结合,Fn 的胶原位点与胶原结合,从而将细胞和胶原联在一起,即 Fn 可介导铺展着的细胞黏连于胶原。能与纤维黏连蛋白结合的细胞外基质成分包括胶原、纤维蛋白、肝素等。此外,纤维黏连蛋白还能结合一些细胞内成分如肌动蛋白、纽带蛋白(vinculin)、α - 辅肌动蛋白(α - actinin)等。

2. 促进细胞的迁移,同时又可使胚胎细胞锚定于底物(substrate)上静止不动。Fn 的这种迁移和锚定的双重功能是由于迁移和静止的细胞之间与细胞骨架相互作用上的差异造成的。通过细胞膜和细胞骨架的相互作用,加强了 Fn、Fn 受体和细胞骨架之间的结合力量,使细胞对底物产生强而稳定的附着,导致细胞完全处于静止状态。

3. 介导细胞的运动和细胞转化,称为固相支持物和化学趋向性物质。在组织创伤修复中,Fn 出现最早,它作为新的组织支架和趋化物从细胞内向伤口移动,也作为调理素促进巨噬细胞吞噬一些损坏的组织碎片和促进创伤的修复。

4. 参与创伤修复。在创伤修复中,Fn 不仅可刺激成纤维细胞增殖,其本身作为一种化学趋化物质,吸引成纤维细胞和血管内皮细胞向伤区移动,进入创伤区的成纤维细胞本身又可迅速地合成和分泌大量 Fn 和 Ⅲ型胶原,二者共同沉积于基质内,成为细胞外基质的主要成分。当肉芽组织成熟时,Fn 和Ⅲ型胶原减少并为Ⅰ型胶原所替代。Fn 还可刺激单核细胞,使其活跃地合成和分泌成纤维细胞生长因子,并刺激血管内皮细胞的生长,作为生长促进因子促进伤口的愈合。

(三)纤维黏连蛋白在牙髓中的分布和作用

1. Fn 在牙髓中的分布

免疫组织化学证明:牙髓和牙乳头中均存在纤维黏连蛋白,而且已能从牙髓中提取到纤维黏连蛋白。培养中的牙髓成纤维细胞能合成并分泌纤维黏连蛋白,但是牙乳头细胞只能合成纤维黏连蛋白却不能将其分泌到培养液中。

在人正常牙髓组织中,Fn 呈细纤维网状分布于前期牙本质、成牙本质细胞层和牙髓中

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

心区，其中成牙本质层、附近的乏细胞层和多细胞层极为丰富，在成牙本质细胞突离开细胞的部位以及成牙本质细胞彼此相黏连的部位呈致密分布。牙髓中心区胶原增多的部位和血管神经束周围分布也明显增多，有的呈网状，有的呈条索状。在成纤维细胞的表面和外围可见 Fn 的纤细网状结构，前期牙本质内呈细丝状排列，而钙化牙本质内未见有分布。

免疫组化电镜观察，Fn 在细胞与细胞、细胞与胶原纤维、胶原纤维与胶原纤维、胶原纤维与无定形基质、血管神经束膜与基质之间呈窄带状分布。特别是成牙本质细胞膜表面，分布密度较高。

在人炎症牙髓组织中，Fn 在牙髓外层的细纤维状排列不明显，牙髓中央区除部分血管周围密度稍高外，均为均质状分布。此种分布状态可能有助于炎症的局限化，有利于游出的炎细胞和组织内的吞噬细胞及时捕捉、吞噬牙髓组织内的外源性和内源性抗原。经图像分析：正常和炎症牙髓外层的 Fn 分布密度远高于牙髓中央区；正常牙髓中央区的 Fn 分布密度远高于炎症牙髓的中央区。表明炎症情况下组织和细胞的变性、生理功能的改变，均可导致 Fn 的合成减少和（或）Fn 消耗过度。

2. Fn 在牙髓中的作用

Fn 在维持成牙本质细胞突和牙本质的位置关系上起重要作用，能使成牙本质细胞有规律地排列在牙髓组织的外围和前期牙本质内层，发挥其形成牙本质基质的功能。

牙髓中合成 Fn 的主要细胞是牙髓成纤维细胞。培养的人牙髓细胞分泌和表达 Fn，它参与调节细胞的分化过程。成熟的 Fn 可分泌到细胞外间质中，也可存留在细胞表面，位于细胞间质中的 Fn，可维持细胞外微环境的稳定，使细胞外间质各种成分有机地组合，并使牙髓细胞稳定于无定形的细胞外间质的网络之中。

当牙髓组织受损时，Fn 能参与和介导牙髓细胞的移动，使露髓深部的牙髓细胞大量分裂增殖迁移至露髓处，分化为新生的成牙本质细胞，发挥相应功能，沉积牙本质。Fn 在牙本质矿化中起启动作用。在 Fn 的启动作用下，牙本质基质矿化，修复创面，达到硬组织愈合。在 $Ca(OH)_2$ 盖髓的实验中，发现 Fn 与最初形成的钙化层有关，提示 Fn 在牙髓细胞分化为成牙本质细胞的过程中可能起调节作用。在脱矿的牙本质盖髓实验中，同样观察到修复性牙本质的形成与牙髓细胞渐进性合成 Fn 增加有关。因此，Fn 可能参与损伤牙髓修复的全过程，它与牙髓的自我修复潜力密切相关。

在采用四唑盐比色法（MTT）和胸腺嘧啶核苷（^3H – TdR）掺入方法测定 Fn 对人牙髓细胞增殖、DNA 合成影响试验中，发现培养液中 Fn 浓度为 20 ~ 40 μg/mL 时，可显著促进人牙髓成纤维细胞增殖和 DNA 合成。Fn 对人牙髓成纤维细胞的作用符合典型的正增殖反应，即低浓度时刺激生长，高浓度时抑制生长的双相反应。若在损伤牙髓中应用 Fn 的复合制剂，可能使细胞迅速黏附，造成新的成牙本质细胞分化所需的界面。Fn 有可能具有促进有丝分裂作用，在牙髓细胞分化为成牙本质细胞过程中起某种调节作用。

二、层黏连蛋白

（一）层黏连蛋白（laminin，LN）的结构

LN 是一个大的糖蛋白分子，约含 13% ~ 15% 的糖，为 4 股绞合的细长结构，由 3 种被二硫键联结糖基化亚单位多肽链构造而成。LN 的分子结构，可能有两种模型：

1. 由 3 个短链的二硫键连于长链。

2. 两条短链，各以其一端靠近中心处缠绕于长链。

LN 和其他细胞外基质成分相结合，包括Ⅳ型胶原、硫酸类肝素蛋白多糖、内功素(entactin)、巢蛋白(nidogen)和肝素。它们的结合位点分别是：Ⅳ型胶原结合位点在短链上，肝素结合位点在长链的球状域，细胞表面结合位点在两或三个短链的交接处，巢蛋白结合位点在一个短链上。

LN 存在于所有基膜中，主要分布在基膜的透明层(lamina lucida)，是基膜中最丰富的成分。由于它和多方面因素的相互作用，使得 LN 在维持基质的稳定以及将细胞锚定于基膜上起重要作用。

(二)LN 的生物学作用

LN 的生物学活性大多是由细胞表面对 LN 的特异受体介导的。LN 对细胞的黏连性很强，很低的浓度(5 μg/mL) 即可促进各种上皮细胞附着在Ⅳ型胶原底物上。LN 能结合于细胞表面或胶原，对上皮细胞和Ⅳ型胶原的结合效果更佳。此时，细胞可迅速黏附并伸展或延长。某些成纤维细胞不识别 LN，故在培养条件下，如介质中含过量 LN 时就不能成活。但有一类胚胎成纤维细胞能识别 LN，能在 LN 存在条件下生长。LN 作为基膜的主要成分能与基膜中的各种成分相结合，包括Ⅳ型胶原、硫酸类肝素蛋白多糖、entactin、nidogen 等。由于 LN 具有多方面的相互作用，故它在基膜基质的组建中起重要作用。

LN 能促进不同类型的细胞生长。由于 LN 可对基质的组装起作用，而基质能促进细胞的生长，故 LN 对细胞生长起作用是由于对细胞提供了适宜的底物。某些细胞在 LN 的作用下可改变细胞的形态，显示出活体内细胞群的特点。体外细胞培养研究表明：LN 还对细胞分化起作用，特别对上皮的形成和 F9 细胞的分化尤为明显。

在正常牙髓，光学显微镜下观察，LN 主要分布在血管周围和雪旺细胞鞘，成牙本质细胞层有少量分布，在电子显微镜下证实 LN 分布在血管和雪旺细胞的基底膜。因此提示，LN 有可能在牙髓神经纤维再生中发挥重要指导作用。体外实验显示：体外培养的牙髓细胞在 LN 存在下可以黏附并伸展，其黏附作用可能受牙髓细胞表达整合素 β1 调节，表明 LN 在牙髓损伤修复过程中可能起某种作用。

三、体外结合素和硫酸软骨素

体外结合素(vitronectin, VN)是一种多功能球蛋白，主要存在于血浆和细胞外基质中，属细胞黏附蛋白，在细胞的增殖、分化、创伤愈合和组织修复中起重要的调节作用。在牙髓组织中，VN 呈不规则细丝状弥漫分布，其中成牙本质细胞层、牙髓血管神经周围和胶原纤维表面以及它们之间分布紧密，其余部位分布稀疏。Bortold(1993)通过软骨素酶 ACⅡ 和软骨素酶 ABC 消化，结合 McAb 和免疫过氧化物酶技术研究，发现硫酸软骨素广泛分布于牙髓结缔组织中，尤以成牙本质细胞层和前期牙本质中最多，提示硫酸软骨素在成牙本质细胞形成牙本质和牙本质矿化过程中具有重要作用。

第四节　糖酵解酶系

糖酵解途径(glycolytic pathway)尽管只能产生少量的 ATP，却是组织细胞内最基本和最重要的代谢途径，这是因为：一方面它是在体内由葡萄糖转变成丙酮酸的唯一重要代谢途

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

径，而丙酮酸经过氧化脱羧进入三羧酸循环才能产生大量 ATP；另一方面它能在无氧条件下产生 ATP。

此外，糖酵解和随后的途径中一些中间产物还可以转变成氨基酸、脂肪酸等。细胞能根据能量或中间产物的需求调节糖酵解的进行，以便控制葡萄糖降解和糖异生（gluconeogenesis）的开关。参与糖酵解的一系列酶多数都是可逆的，只有己糖激酶、磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶三种酶的作用为不可逆。牙髓组织中的糖酵解与牙齿的萌出、吸收和钙化有关，因而分析牙髓中的糖酵解酶系对于深入了解糖酵解在牙齿发育中的作用有重要意义。

一、磷酸果糖激酶

磷酸果糖激酶（phosphofructokinase，PFK）催化如下反应：

$$6-\text{磷酸果糖} + ATP \rightleftharpoons 1,6-\text{二磷酸果糖} + ADP$$

PFK 是糖酵解最关键的限速酶（limiting enzyme），糖酵解的速度主要受 PFK 的控制，许多代谢物或者是此酶的变构激活剂，或者是其变构抑制剂，亦即 PFK 催化的反应正是许多代谢物调节作用的焦点。由上式可见，PFK 有两个底物（substrate），作为磷酸基受体的 6－磷酸果糖特异性强，而作为磷酸基供体的 ATP 特异性较差，除 ATP 外、GTP、CTP、UTP、ITP 均可作为磷酸基供体。ATP 既是 PFK 的底物，又是它的变构抑制剂。6－磷酸果糖则可解除 ATP 对 PFK 的抑制。此外，1,6－二磷酸果糖、2,6－二磷酸果糖、AMP 等都是 PFK 的激活剂，而柠檬酸盐和烯醇式磷酸丙酮酸盐等则是 PFK 的抑制剂。

分析猪的乳牙牙髓，发现随着牙根发育的不同时期，牙髓的 PFK 活性有所改变。例如从牙根形成期（2 个月）到牙根吸收期（9 个月），磨牙牙髓 PFK 的活性比（specific activity）下调，又 6－磷酸葡萄糖脱氢酶（G6PD）/PFK 活性比值在牙根吸收期高于牙根完全形成期（6 个月）。6－磷酸葡萄糖是糖酵解开始阶段的中间代谢物，它受 6－磷酸葡萄糖脱氢酶（非糖酵解酶系的酶）的作用转变成 6－磷酸葡萄糖酸，后者则可进入磷酸戊糖循环（又称磷酸己糖支路，hexose monophosphate shunt，HMS），它是不同于糖酵解的另一条糖代谢通路，其生理意义主要在于产生还原性辅酶Ⅱ（NADPH）和 5－磷酸核糖，前者作为供氢体参与体内多种生物合成反应；后者是合成核苷酸辅酶和核酸的主要原料，故损伤后修复再生的组织，此代谢途径都比较活跃。G6PD/PFK 活性比值的高低反映糖酵解和磷酸戊糖循环两条途径孰强孰弱（图 6.5）。

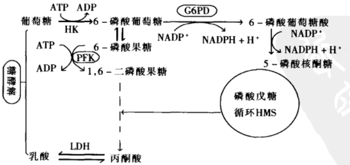


图 6.5 两种酶与两条代谢途径的关系

（注 HK：己糖激酶 LDH：乳酸脱氢酶 NADP⁺：氧化型辅酶Ⅱ NADPH：还原型辅酶Ⅱ）

二、丙酮酸激酶

丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)催化如下反应:

磷酸烯醇式丙酮酸 + ADP→丙酮酸 + ATP

丙酮酸激酶催化的反应产物——丙酮酸处于糖酵解途径(不需氧)与需氧氧化阶段的衔接点。丙酮酸经氧化脱羧生成乙酰辅酶A,后者通过三羧酸循环(TCA cycle)最终被氧化产生 CO_2 和 H_2O,并释放大量能量(以ATP的形式)。

在牙根发育过程中,牙髓PK呈现与PFK类似的变化。与PFK不同的是PK的性质较稳定,便于对其理化特性进行深入的研究。已确定PK分子为同质四聚体,在哺乳类动物组织存在四种同工酶,即L、M1、M2和R型PK。牙髓中的PK约80%为M1型(即骨骼肌型)。

三、乳酸脱氢酶

乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)催化如下可逆反应:

$$\text{丙酮酸} + \text{NADH} + H^+ \rightleftharpoons \text{乳酸} + \text{NAD}^+$$

(还原型辅酶 I)　　　　　　(氧化型辅酶 I)

LDH催化的反应是糖酵解的最后一步反应,乳酸是糖酵解的终产物。丙酮酸在无氧条件下还原成乳酸;乳酸在有氧条件下氧化成丙酮酸。体内乳酸除氧化成丙酮酸外,别无其他代谢途径。LDH呈四聚体,分子量为135kDa,其亚基(单体)有两种,即M(肌肉型)和H(心脏型)。

按可能的组合方式,LDH共有5种同工酶,即LDH-1 (H_4),LDH-2 (H_3M),LDH-3 (H_2M_2),LDH-4 (HM_3)和LDH-5 (M_4)。心、肾中的LDH主要为LDH-1和LDH-2,即富于H亚基。肝和骨骼肌中则主要为LDH-5和LDH-4,即富于M亚基。

牙髓中LDH同工酶的分析,不同种属和不同取样部位结果有所差异。例如Linde和Ljunggren报道,人前磨牙牙髓主要含LDH-3和LDH-4,反映该组织的无氧糖代谢特征。然而,大鼠切牙牙髓中却主要含LDH-1和LDH-2,反映有氧代谢特征,作者对此差异的解释是由于人前磨牙与大鼠切牙生长速度的不同。Sato等(1985)报道:LDH-1和LDH-2分别占猪牙髓LDH总活性的63%和23%。另外,有人从2~21 d小鼠正在发育的第一磨牙牙髓组织中检测到全部5种LDH同工酶,但是在10 d后的小鼠,LDH-1和LDH-2消失。

值得注意的是牙髓组织的糖酵解酶系活性的动态变化可能与其生长速度和牙本质生成的步骤密切相关,酶的类型可随细胞对能量和代谢物的需求而改变。

由于LDH是一种性质稳定、易于检测的酶,还可用组织化学法粗略定量,所以有许多研究致力于探讨各种抗生素、含甲醛的药物、局部麻醉药以及制洞等对牙髓组织和细胞的酶的影响,并提出可将LDH作为测试药物毒性的一项指标。

(王成济,文玲英,王英)

参考文献

1. Linde A, Ljunggren A. Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns of human dental pulp. J Dent Res. 1970;49(6):suppl:1469

2. Van Amerongen JP, Lemmens IG, Tonino GJ. The concentration, extractability and characterization of collagen in human dental pulp. Arch Oral Biol. 1983;28(4):339

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

3. Van Amerongen JP, Lemmens IG, Tonino GJ. Immunofluorescent localization and extratability of fibronectin in human dental pulp. Archs oral Bial. 1984;29:93
4. Ruch JV. Odontoblast differentiation and the formation of odontoblast layer. J Dent Res. 1985;64(spe):489
5. Tinker D and Rucker RB. Role of selected nutrients in synthesis, accumulation, and chemical modification of connective tissue proteins. Physiol Rev. 1985;65(3):607
6. Kishi J, Kawai T, Hayakawa T. Immunohistochemical localization of collagenase inhibitor in bovine dental pulp, pulp cells in monolayer culture, and in some oral connective tissues. Arch Oral Biol. 1985;30(7):571
7. Sakamoto S, Baird SA, Sakamoto M. Collagenase synthesis in clonal rabbit odontoblast - like cells (RP cells). Biochem Biophys Res Commun. 1985 Dec 17;133(2):709
8. Karjalainen S, Soderling E, Pelliniemi L, et al. Immunohistochemical localization of type Ⅰ and Ⅲ collagen and fibronectin, in the dentine of carious human teeth. Archs Oral Biol. 1986;31:801
9. Provenza DV, Seibel W. Oral histology: inheritance and development. 2nd ed philadephia: Lea and Febigor, 1986;29
10. 李玉端. 细胞外间质的生物化学及研究方法. 第1版. 北京：人民卫生出版社.1989:100
11. Thesleff I. Interaction between the extracellular matrix and the cell surface determine tooth morphogenesis and the cellular differtiation of the dental mesenchyme. Ontogeneze. 1989;20(4):341
12. Bronckers ALJJ, Lyaram DM, Woltgens JHM. Immunohistochemistry of extracellular matrix proteins during various stages of dentinogenesis. Connective Tissue Res. 1989;22(2):65
13. Veron MH, et al. Expression of fibronectin and type I collagen by human dental cells and gingiva fibroblasts grown in fibronectin. Arch Oral Biol. 1990;37(7): 565
14. Inoki R, Kudo T, and Olgart LM. Dynamic aspects of dental pulp——molecular biology, pharmacology and pathophysiology. CHAPMAN & HALL 1990 1st Ed.
15. 郑国昌、翟中和. 细胞生物学进展(第2卷). 第1版. 北京：高等教育出版社. 1991: 18
16. Andujar MB, Coublep, Couble ML, et al. Differential expression of type Ⅰ and type Ⅲ collagen genes during tooth development. Development. 1991;111(3):691
17. Kuc MYP, Lan WH, Lin SK, et al. Collagen gene expression in human dental pulp cell cultures. Arch Oral Biol. 1992;37(11):945
18. Lukinnaa PL, Waltimo J. Immunohistochemical localization of type Ⅰ、Ⅴ and Ⅵ collagen in human permanent teeth and periodental ligament. J Dent Res. 1992;71 (2):391
19. Tziafas D, et al. Dentinogenic activity of allogenic plasma fibronectin on dog dental pulp. J Dent Res. 1992; 71(5):1189
20. Fried K, Risling M, Edwall L, Olgart L. Immuno - electron - microscopic localization of laminin and collagen type IV in normal and denervated tooth pulp of the cat. Cell Tissue Res. 1992; 270(1):157
21. 文玲英、吴海珍、王伯云. 年轻恒牙牙髓中几种细胞外基质的分布特征 . 中华口腔医学杂志. 1994;29(3):186
22. Yoshiba N, Yoshiba K, Iwagu M, et al. A confocal laser scanning microscopic study of the immunofluorescent localization of fibronectin in the odontoblast layer of human teeth. Arch Oral Biol. 1994;39(5):395
23. 汪平、郝建军、史俊南. 牛血浆纤维黏连蛋白对人牙髓成纤维细胞增殖、DNA合成、细胞形态的影响. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1995;5(2):80
24. 汪平、史俊南、郝建军. 人牙齿胚胎发育的免疫组化研究. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1995;5(4): 220
25. Tziafas D, Panagiotakopoulos N, Komnenou A. Immunolocalization of fibronectin during the early response of dog dental pulp to demineralized dentine or calcium hydroxide - containing cement. Arch Oral Biol. 1995;40

(1):23

26. Yoshiba K, Yoshiba N, Nakamura H, et al. Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in human teeth after pulp capping with calcium hydroxide. J Dent Res. 1996;75(8):1590

27. Hillmann G, Geurtsen W. Light – microscopical investigation of the distribution of extracellular matrix molecules and calcifications in human dental pulps of various ages. Cell Tissue Res. 1997 Jul;289(1):145

28. Webb PP, Moxham BJ, Ralphs JR, et al. Immunolocalization of collagens in the developing rat molar tooth. Eur J Oral Sci. 1998 Jan;106 Suppl 1:147

29. Zhu Q, Safavi KE, Spangberg LS. The role of integrin beta 1 in human dental pulp cell adhesion on laminin and fibronectin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998;85(3):314

30. Felszeghy S, Hollo K, Modis L, et al. Type X collagen in human enamel development: a possible role in mineralization. Acta Odontol Scand. 2000;58(4):171

31. Martinez EF, Machado de Souza SO, et al. Immunohistochemical localization of tenascin, fibronectin, and type III collagen in human dental pulp. J Endod. 2000;26(12):708

32. Wang P, Hao J, Shi J. Actions of bovine plasma fibronectin on cultured human dental pulp cells. Chin J Dent Res. 2000;3(1):55

33. Palosaari H, Tasanen K, Risteli J, et al. Baseline expression and effect of TGF – beta 1 on type I and III collagen mRNA and protein synthesis in human odontoblasts and pulp cells in vitro. Calcif Tissue Int. 2001;68(2):122

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

第七章　牙髓神经生物学

第一节　牙髓神经的发育和组织学

一、来源和通路

牙髓的躯体感觉神经起源于三叉神经节，上颌牙经由上颌神经进入牙髓，下颌牙经由下颌神经进入牙髓。牙髓的肾上腺素能神经起源于颈上神经节，肾上腺素能神经进入牙髓有两条途径：

1.肾上腺素能神经离开颈上节后，依次环绕颈总动脉、颈外动脉、上颌动脉，最后分别环绕上、下牙槽动脉进入上、下颌牙齿，这是肾上腺素能神经进入牙髓的主要通路。

2.Metthews B 和 Robinson PP(1980)通过电生理方法证实：少量肾上腺素能神经纤维从颈上节走向三叉神经节，伴随感觉神经进入牙髓。

因而，下牙槽神经中既有躯体感觉神经，又有肾上腺素能神经，Tonder KH 和 Nass G (1978)应用电生理方法证实了这一推论。

二、分布

(一)感觉神经

牙髓感觉神经以一支或多支进入牙髓，与其他的外周感觉神经相似，这些神经中含有相互平行、交替排列的有髓和无髓神经纤维。牙髓神经平行于牙根长轴行走于根髓中，只有少量神经纤维在根髓中形成终末分支，其数量不超过神经纤维总数的 10%。牙髓神经进入冠髓后逐渐分支，呈树枝样，并在多细胞层下形成神经丛，尚不清楚神经丛的功能以及与牙本质形成的关系。从神经丛发出大量分支，分布于牙髓牙本质交界区，形成特征性的串珠样终末结构。

许多学者发现在牙本质中有神经纤维样结构存在，多数纤维只进入牙本质数微米，一些纤维可进入牙本质小管 150～200 μm。许多发现确实支持这些结构为神经纤维：这些结构形态上与神经纤维或末梢一致；其中所含的线粒体、囊泡、神经管和神经丝与身体其他部位已知神经结构的细胞器相似；纤维末端膨大呈长椭圆形，长轴与牙本质小管一致，长径是短径的 2～4 倍；当神经干切断后，这些结构发生退变。这些神经纤维分布主要有 4 种形式：

1.单一的神经纤维从神经丛发出，进入成牙本质细胞层。

2.单一的前期牙本质神经纤维直线或螺旋形穿行于小管中。

3.多个神经纤维在前期牙本质中互相交通，并形成大量末端分支和膨大。

4. 直线走行于牙本质小管内的神经纤维，这些纤维可进入牙本质达 100 μm 左右。

(二)肾上腺素能神经

在发育完全的牙齿中，肾上腺素能神经纤维的数量可能不超过牙髓神经纤维总数的10%。应用追踪剂和荧光染料技术发现肾上腺素能神经在血管周围形成神经网，但也有一些肾上腺素能神经纤维与血管无明显关系。

肾上腺素能神经纤维末梢在大鼠磨牙牙髓中的分布如下：纤维末梢主要分布于髓角和冠髓中央区，分别占肾上腺素能神经纤维总数的49%和36%；而在分叉区和根髓较少，分别占7%和8%。此外，肾上腺素能神经还可以自由神经末梢或血管相关性神经末梢的形式存在于牙本质形成区，通常在成牙本质细胞基底端附近。Inoue H，Kurosaka Y，Abe K(1992)利用透射电镜发现在成牙本质细胞与前期牙本质的交界区以及前期牙本质内有肾上腺素能神经纤维末梢存在，一些神经末梢与胶原形成关系密切。

(三)胆碱能神经

在牙髓中胆碱能神经存在的证据较少。一些学者发现在成牙本质细胞层、成牙本质细胞层下神经丛有乙酰胆碱和胆碱脂酶。Avery JK，Cox CF，Chiego DJ(1980)报道在牙髓中央区和牙本质小管发现胆碱能神经末梢。Inoue H，Kurosaka Y，Abek(1992)利用透射电镜在前期牙本质发现胆碱能神经纤维末梢，这些末梢与肾上腺素能神经末梢相伴行。

三、牙髓发育和增龄中的牙髓神经变化

牙齿与其他感觉器官相比成熟较晚。牙齿不但进入外界环境的时间远远晚于其他器官，而且在神经发育完成前就已开始行使功能。在牙胚蕾状期，牙槽神经位于牙胚附近区域，帽状期早期牙槽神经在牙乳头基底部形成神经丛，并在帽状期晚期进入成釉器。因而成釉器比牙乳头较早受到神经支配。最早进入牙胚的神经纤维为无髓神经纤维，其功能尚不清楚。

牙齿萌出后有髓神经纤维在数量上变化显著，而其直径变化不显著。例如，人下颌第一前磨牙在刚萌出时可有400根有髓神经纤维，而有些前磨牙在同一时期可能只有不到100根有髓神经纤维。年轻的第一前磨牙牙髓中有髓神经纤维数量与对侧同名牙相比往往有显著差异。前磨牙萌出5年后，其牙髓中有髓神经纤维可达700根。以上现象可以解释临床上健康年轻恒牙活力试验结果变化较大，可靠性差；而发育完成的恒牙活力试验阈值低，且较恒定。

无髓神经纤维在牙齿萌出不久即达到其最大数量。发育完成的人前磨牙平均含有1 800根无髓神经纤维。通过无髓神经纤维周径的研究发现：与发育完成的牙齿相比，新萌出牙齿具有较多粗大的无髓神经纤维(周径可达1.5 μm以上)，其中一部分可能转变为有髓神经纤维。

随着年龄继续增长，牙髓中的神经纤维数量趋于减少。在牙齿生存期中，牙髓神经纤维的变化是一个动态的过程：牙髓神经纤维从生长期逐渐向退变期转化。而在成牙本质细胞层、前期牙本质以及牙本质中的神经末梢形态和分布变化不明显。

乳牙牙髓神经的发育过程与恒牙相似，当牙根吸收时，牙髓神经开始发生退变。只不过乳牙牙髓神经发育周期比恒牙要短得多。

第二节　牙髓神经的分类和特征

牙髓神经纤维可分为有髓鞘的A纤维和无髓鞘的C纤维。A纤维根据直径又分为Aβ

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

和 Aδ 纤维。Aδ 纤维为快传导，低刺激阈，对缺血敏感，可快速丧失其活性，对热刺激的反应为即刻的尖锐痛。C 纤维为慢传导，反应为延迟的钝痛，对缺血较不敏感，维持功能的能力优于 Aδ 纤维，牙髓 Aδ 纤维和 C 纤维共同担负着牙髓的痛觉传导功能(表 7.1)。Aβ 纤维直径为 6～22 μm，传导速度为 33～75 m/s，多数学者认为 Aβ 纤维可能介导痛前感觉和本体感觉。

表 7.1　痛觉感受性 Aδ 纤维和 C 纤维的特征

	Aδ 纤维	C 纤维
直径	2～5 μm	0.3～3 μm
传导速度	5～30 m/s	0.5～2 m/s
髓鞘	有	无
发育	晚，牙齿萌出数年后发育成熟	早，牙齿萌出后短时间内发育成熟
感受方式差异	牙本质小管液体移动可引起其兴奋	似对直接作用于牙髓的有害刺激起反应
对各种刺激的反应性	电、温度、机械刺激刺激阈低，但对炎症介质不敏感	电、温度、机械刺激刺激阈高，但对炎症介质敏感
诱发放电形成	立即出现高频放电后可能有放电减少，去除刺激后放电很快消失	经一段潜伏期出现放电，数目渐多，去除刺激后有余留放电
介导疼痛性质	快痛，呈锐痛，定位明确	慢痛，为难以忍受的钝痛，定位不明确(放射痛)
耐受性	对机械损伤耐受力强，抗缺氧、炎症能力差，压力易使其传导阻滞	对炎症、缺氧、压力耐受性强，抗损伤能力差

另外，无髓神经纤维中有少量传出性肾上腺素能神经。Johnsen DC(1985)发现在狗尖牙前期牙本质中有肾上腺素能神经纤维末梢，并在胶原形成区附近有广泛的胞吐和脱颗粒现象，认为肾上腺素能神经除调节血管及痛觉传导外，还可能与胶原形成有关。

第三节　牙髓神经活动的记录

一、动物牙髓神经活动的记录

(一)牙本质记录

在实验动物(猫、狗)尖牙唇面制备两个相距数毫米深达牙本质的洞，将记录电极置洞内，电极另一端连于放大器和记录装置，从而可通过放电的频率来测定感受器的兴奋性以及定量分析其对某一刺激的感受性，但这种牙髓神经活动的牙本质记录有一定的局限性，因为只能记录 A 纤维的活动。

(二)单一神经纤维放电记录

在立体显微镜下，从动物上颌或下颌神经中逐一分离神经细束，连于引导电极，置放大器、示波器等记录装置，将刺激施于某一牙齿，如能记录到单根纤维的动作电位，说明此纤维为该牙的感觉神经纤维。这种方法的优点是不但能记录 Aδ 纤维的活动，还可记录 C 纤维的活动，反映不同类型感受器的特征，实验结果也更精确、可靠。在单一神经纤维记录中，可以根据传导速度大致区分 A 纤维和 C 纤维，但由于神经纤维在进入根尖孔前后直径不同，因而传导速度也不一致，只根据传导速度分类不够精确，还要根据电刺激阈、不应期以及对机械、热、化学等刺激的反应特征综合分析。但此方法技术难度较大：一方面，要在

整个神经干中寻找占比例很少的某一牙齿的感觉神经纤维；另一方面，单一神经纤维尤其是C纤维在分离过程中极易受损。组织学研究发现牙髓神经80%为C纤维，而实验记录到的C纤维却很少。

二、人牙髓神经活动的记录

利用因正畸、牙周病需拔除的牙齿，在牙颈部和冠部制备深达牙本质的洞，安放记录电极，连接放大器、示波器等记录装置，施刺激于牙齿，记录牙髓神经活动，并可与受试者的主观感觉进行对照研究。由于只能记录A纤维的活动，因而牙髓神经活动的记录结果与受试者的主观感觉不完全符合。

组织学和神经生理学研究表明：猫与人牙髓神经在形态和功能上都相似。综合考虑A纤维和C纤维的神经活动，则动物实验和临床实验结果相符性良好。

第四节　牙髓神经对外源性刺激的反应

一、机械刺激

大多数A纤维可被冯雷触毛(von frey hairs)直接刺激牙髓所兴奋，许多A纤维也对作用于牙本质表层和深层的探查、气吹、钻磨产生应答，后一种情况可能是由于这些刺激引起牙本质小管内液体移动，外周牙髓组织机械变形，以致神经兴奋。与A纤维不同，只有部分C纤维对作用于牙本质深层和牙髓的机械刺激有反应，表明C纤维与A纤维对机械刺激的敏感性不同。另外，两类纤维在牙髓中的分布也可能是一个原因。牙本质的表面状态对机械刺激作用于牙本质所产生的结果也有明显影响：牙本质表面酸蚀后小管口开放，机械刺激可引起多数A纤维的兴奋；而未经酸蚀或酸蚀后表面涂用草酸钾、树脂等封闭牙本质小管，则使产生兴奋的纤维数目显著减少。

二、温度刺激

有关温度刺激对牙髓神经活动的影响结果各异，所测得阈值相差很大。原因之一是实验条件和方法不同；另外，牙髓神经对温度刺激的反应似乎有一种以上机制。以前的研究大都只记录了A纤维的活动。最近的实验表明：A纤维和C纤维对温度刺激的反应不同；许多神经可对几种不同类型的刺激敏感。

Jyvasjarvi E 和 Kniffki KD(1989)通过猫尖牙单一牙髓神经记录，发现在记录到的13根Aδ纤维和43根C纤维中，84%的Aδ纤维和88%的C纤维可被冷刺激兴奋，所以冷敏的Aδ纤维对速冷的反应比较一致，首先是高敏放电，随着温度下降率的减小，放电频率也降低，当温度达到恒定时放电消失，在牙齿复温过程中无放电发生，Aδ纤维最初的平均放电频率与最大温度下降率呈良好的线性相关($r=0.89$)；C纤维对冷刺激的反应同样较规律，但与Aδ纤维不同，刺激初无放电，经过平均7.3 s的潜伏期，牙髓温度下降率已很小时才开始规律的低频放电，放电频率与牙齿的最终温度间呈弱的线性相关($r=0.6$)。而当同样的冷刺激作用于人牙时，受试者描述为一种定位明确的刺痛，结合动物实验结果可以推测：人牙受冷刺激时可能主要是Aδ纤维兴奋。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

牙髓神经对热刺激的反应似乎是双相的，Aδ 纤维可被速热兴奋，这可能是由于液体动力学原因。当热持续作用于牙齿，使牙髓温度达到 43.8℃ ± 3.4℃时，C 纤维才开始兴奋。这与临床实验结果一致：热刺激后迅速出现定位准确的刺痛，继而转变为持续的放射性钝痛。

三、电刺激

在动物实验中，电刺激被用来区分牙髓神经纤维。同时，由于电刺激可引起急性实验性痛，因而被广泛用于疼痛研究。牙髓电刺激存在两方面的技术问题：其一，牙齿硬组织具有很高的阻抗；其二，电流进入周围组织。由于牙齿各部分解剖和阻抗不同，必须应用直流电，现多采用矩形方波。有关采用单极还是双极问题上，存在一些分歧。双极刺激电流局限于冠部牙髓，结果可靠，但双极刺激时刺激回路的阻抗是单极刺激的两倍。此外，牙齿周围组织神经刺激阈要比牙髓高得多，因而一般认为单极刺激所得结果是可靠的。动物实验和临床实验现多采用单极刺激，将参考电极置身体其他部位。测定牙髓神经纤维传导速度时，一般采用波宽为 1 ms 的矩形波，而测定其刺激阈时，多采用波宽 10 ms 的矩形波。动物实验测得猫牙髓 A 纤维和 C 纤维的电刺激阈分别为 8.4 ~ 13.5 μA 和 37.4 ~ 40.4 μA。阈值或接近阈值的电刺激可引发痛前感觉，多数学者认为是 Aβ 纤维兴奋的结果，刺激强度继续升高，则转变为痛觉。

四、化学刺激

龋损牙症状的有无和轻重与很多因素有关，至今了解甚少。一些学者用猫对龋病代谢产物的牙髓神经活动的影响进行了研究：在深达牙本质深层的洞内(伴或不伴露髓)，一定剂量的氨可引起牙髓神经持续放电，一直到氨被清除为止，所以，神经末梢周围的 NH_4^+ 离子聚集可能与痛有关，吲哚、脲等生物活性物质也以同样的方式兴奋牙髓神经。在牙本质龋中发现的众多酶中，只有磷酸酶对牙髓神经有兴奋作用，在龋损牙本质中通常可以见到的乳酸和其他一些有机酸，即使应用于近髓洞底或直接作用于牙髓也不会引起牙髓神经兴奋。相反，还会抑制由其他一些刺激引起的牙髓神经兴奋，其机制可能是这些有机酸使牙本质中的 Ca^{2+} 释放、聚集或使 H^+ 聚集，从而抑制了牙髓神经兴奋性。但当这些有机酸作用于浅层牙本质时，却能提高其他刺激对牙髓神经的作用，这可能是由于有机酸可清除牙本质表面玷污层，使刺激易于进入的缘故。

有些高渗液如高渗氯化钙、高渗蔗糖作用于经酸蚀的牙本质浅层可引起牙髓神经放电，这可能与牙本质感觉的液体动力机制有关。但 Ca^{2+} 直接作用于牙髓神经时可抑制其活动。而蔗糖对牙髓神经的直接作用是兴奋，将蔗糖作用于经酸蚀的深层牙本质或牙髓时，可引起持续性神经放电，直到蔗糖被清除为止。但并非所有的高渗液作用于牙本质浅层均会引起牙髓神经活动，其原因尚不清楚，例如高渗氯化钠液，作用于浅层牙本质时，不会引起牙髓神经活动，作用于深层牙本质或牙髓，则可引起神经放电，推测 Na^+ 可能具有兴奋神经细胞膜的作用。

Bilotto G，Markowitz K，Kin S(1986)通过动物实验发现作用于深层牙本质的 0.756 mol/L 氯化钠液可对 3 mol/L 氯化钠液引发的牙髓神经放电产生双相作用：开始 10 ~ 20 s 的短期兴奋作用，和持续至少 10 min 的抑制作用。将氯化钾液施于人牙牙本质，并不引起疼痛，

但 K^+ 对牙髓神经的作用机制尚不清楚。

总之，当化学因素作用于浅层牙本质时，其渗透压起着主要作用；当作用于深层牙本质或牙髓时，其化学成分起主要作用。此外，牙本质表面玷污层是否去除，对化学刺激的作用效果也有一定影响。

第五节 内源性因素对牙髓神经的影响

一、炎性刺激

有关局部炎症对牙髓神经影响的研究，结果相差较大。最初，有些学者将牙菌斑置猫牙洞内，不同时间进行观察，发现牙髓神经活动与炎症反应的程度不一致。但由于这种方法缺乏可重复性，故无法进一步研究抗炎药对牙髓痛觉的影响。

当牙髓发生感染、创伤、变态反应时，细胞膜、血管、肥大细胞和神经末梢释放炎症介质，包括组胺、缓激肽、5-羟色胺、K^+、乙酰胆碱、前列腺素（prostaglandins，PGs）、白三烯（leukotrienes，LTs）和神经肽等。这些介质可通过以下两条途径兴奋牙髓神经：降低牙髓神经兴奋阈而直接引起疼痛；引起小动脉扩张、小静脉渗出，以致牙髓组织水肿，压力升高，间接地兴奋牙髓神经。在这些介质中前列腺素的作用越来越受到重视，但是似乎没有一种基本介质介导疼痛，而是几种致痛体系起作用。猫牙本质-牙髓复合体电位记录发现：热牙胶短时、重复刺激牙本质表面可引起长时间的牙髓神经放电；如果刺激前给予猫全身用非类固醇抗炎剂（如消炎痛、萘普生等），一定剂量时可抑制这种持续性放电。而这些药物对速热引起的即刻牙髓神经放电无影响。由于这些抗炎剂是 PGs 合成的有力抑制剂，可以推测 PGs 为牙髓炎症某些阶段痛过敏的介质，这种致敏作用是否由于 PGs 对神经的直接作用还有待于进一步研究。采用只能记录到 A 纤维活动的牙本质记录方法发现：PGs、缓激肽、组胺均不会引起牙髓神经兴奋，只有 5-羟色胺可引起牙髓神经放电；组胺还因导致循环障碍和压力升高而阻断 Aδ 纤维。单纤维记录发现组胺、缓激肽可兴奋 C 纤维，进一步证实主要是 C 纤维对炎症介质敏感。

A 纤维和 C 纤维均可被炎症过程中牙髓压力升高所兴奋，但持续性压力升高则易使 A 纤维传导阻滞，而且 A 纤维对炎症晚期血液循环障碍引起的缺氧的耐受力也较差。这可以解释临床上牙髓炎的晚期，患者主诉多为放射性钝痛，但牙髓炎症是复杂多变的，牙痛也是多方面因素决定的，因而不能只根据疼痛的有无和轻重推断炎症的程度。

有些学者通过置于动物下牙槽神经的电极逆向刺激牙髓感觉神经，结果发现：在经 α-肾上腺素能神经阻断后，刺激下牙槽神经会引起短暂的血管扩张、牙髓血流量增加，继而液体渗出、压力持续升高、循环障碍，后一过程可被抗组胺药（如新安替根）阻断；牙髓神经兴奋性发生双相变化，短暂的兴奋性升高，然后是持续性抑制。上述变化通常被称为神经源性炎症。神经源性炎症可能是由 C 纤维末梢释放的 P 物质（substance P，SP）介导的，近年来的研究提示还可能与神经激肽 A（neurokinin A，NKA）、神经激肽 B（neurokinin B，NKB），特别是降钙素基因相关肽（calcitonin gene-related peptide，CGRP）有关。SP 可直接舒张小动脉，并可通过使肥大细胞释放组胺来间接增加静脉的通透性。逆行刺激下牙槽神经时牙髓神经兴奋性改变的机制尚不清。含 SP 的 C 纤维还似乎与其他原因引起的炎症的发展有

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

关。近年来的研究发现：含 SP 的神经末梢是化学敏感性的，如它们可被缓激肽激活，生长激素释放抑制因子、吗啡可抑制 SP 的释放。在三叉神经中发现了生长激素释放抑制因子，牙髓细胞和神经中发现有脑啡肽和 β－内啡肽，因而有可能存在一个调控 SP 的局部反馈系统。同时，脑啡肽、β－内啡肽还可能与痛觉的感知和传递有关。

二、牙髓血流量

采用同时记录牙髓血流量和牙髓神经活动的实验方法，发现局部微循环的变化对牙髓神经功能有明显影响。在猫牙根尖区注射肾上腺素或刺激肾上腺素能神经会引起牙髓血流量的下降，以致牙髓神经兴奋性下降，因而推测牙髓神经的兴奋性受血流量的调制。进一步实验表明：只有当牙髓血流量下降 90% 达 10 min 以上才会影响牙髓神经兴奋性。一般认为：A 纤维在牙髓血流量下降所致的缺氧环境中很快失去功能，而 C 纤维对血流量下降有较强的耐受力；牙髓血流量的升高可直接使 A 纤维兴奋性升高，对 C 纤维作用很小，但可通过牙髓压力的升高间接提高 C 纤维的兴奋性。

第六节　药物对牙髓神经的作用

一些用以缓解牙髓炎症状的药物具有抑制牙髓神经兴奋性的作用。氧化锌丁香油糊剂可迅速抑制化合物 48/80（一种促组胺释放剂）作用于露髓深洞引起的牙髓神经持续性放电，单独用丁香油也有相似的作用，这种作用是可逆的；鼠有髓神经体外实验提示：丁香油可直接作用于神经细胞膜。甲醛甲酚合剂、樟脑酚也可抑制牙髓神经放电，但这种作用是不可逆的，可能与它们的神经毒和失活作用有关。

不同厂家生产的氢氧化钙糊剂也被用于实验，而只有 Dycal 能抑制牙髓神经持续放电，抑制作用是可逆的，这种作用似乎不是产品中的 Ca^{2+} 的缘故，而可能是其他成分，因为氢氧化钙制剂中 Ca^{2+} 含量不足以在数小时内抑制牙髓神经兴奋性；除 Dycal 外，其他一些氢氧化钙制剂用于临床也会出现疼痛减轻现象，这可能是它们与牙髓组织发生反应所产生的间接作用。

动物实验发现：丁香油和樟脑酚对热引起的牙髓神经放电无作用，这可能是由于与化合物 48/80 相比，热引起的牙髓炎症的程度较重、范围较广的缘故。所以，对于临床广泛性牙髓炎，上述药物不能有效地缓解疼痛。

（曹志中）

第七节　牙髓中的神经肽

神经科学研究以神经肽的发现和研究为主题进入了新高潮。有些神经肽已被确认是递质，但神经肽所参与的神经活动远较经典递质广泛而复杂，几乎每一个生理或病理过程都有神经肽参与。近年来，通过免疫组织化学方法证实牙髓中有多种神经肽存在，这些神经肽可能参与了牙髓炎症、变态反应、修复及疼痛的传导等过程。

一、神经递质和神经肽

神经递质是指神经细胞和它们的胞浆突中所含的物质。神经受到刺激，这些物质可从

神经末梢释放，并在相邻细胞间发生神经传递。经典的神经递质既可在轴突末梢合成，也可在胞体合成后经由轴浆运输到轴突末梢以囊泡形式储存备用。多数经典递质还能在完成使命后被轴突末梢重新摄取、再利用。神经元之间的信号传递主要发生在突触部位，突触传递的中心环节必须有神经递质参与。有些物质与神经递质有相似的特征，但在突触传递中只起到辅助作用，这些物质通常被称为神经调节物（neuromodulator）或神经调质（neuroregulator）。神经肽是一种包含在神经系统中的多肽，与经典递质不同，神经肽必须在胞体合成，经轴浆运输后到达末梢，并以囊泡形式贮存备用。药理学和生理学实验发现一些神经肽已达到神经递质标准，但多数神经肽在神经活动中作为神经调节物。

二、感觉神经中的神经肽

至今，在牙髓中发现了来源于三叉神经节的 3 种神经肽：P 物质、降钙素基因相关肽和神经激肽 A（neurokinin A，NKA）。

（一）P 物质（substance P，SP）

1．SP 的生物学特性：

SP 是最早发现的神经肽之一。Von Eulen 和 Graddum（1931）从脑组织和肠内提取一种收缩平滑肌和降低血压的物质，取名为 P 物质，1971 年阐明其结构为 11 肽。目前 SP 前体已用重组 DNA 技术克隆成功，发现其有两种前体，一种仅含 SP 片段，称为 α－前速激肽原（α－preprotachykinin）；另一种同时含有 K 物质（SK）片段，称为 β－前速激肽原（β－preprotachykinin）；天然的 P 物质是含有 11 个氨基酸残基的直链多肽，分子量在 1 000～2 000 Da 之间，人工合成的 P 物质肽链长短不一，生物活性也不同。

2．SP 在牙髓中的分布：

SP 是牙髓中最早发现的神经肽。SP 是在初级传入无髓神经纤维的胞体合成的，通过轴流向中枢和外周运送，当神经受到刺激时从神经末梢释放出来。SP 的释放可被生长激素释放抑制因子（somatostatin，SOM）和阿片肽所抑制，同时，在人牙髓血管周围发现有 SOM、亮氨酸脑啡肽（leucine－enkephalin，L－ENK）和蛋氨酸脑啡肽（methionine－enkephalin，M－ENK）免疫反应性神经纤维，提示牙髓中可能存在调节 SP 释放的局部反馈系统。含 SP 的神经纤维伴随血管经根尖孔成束地进入牙髓，平行于牙根长轴行走于根髓中，许多含 SP 的神经纤维围绕血管周围（图 7.1）。



图 7.1　大鼠磨牙根尖孔和根髓 SP 阳性神经纤维　×25

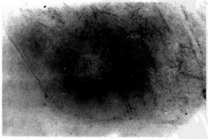


图 7.2　大鼠磨牙冠髓 SP 阳性神经纤维　×25

并非所有的血管都有含 SP 的神经纤维伴随，也并非所有含 SP 的神经纤维都围绕在血管周围，一些含 SP 的纤维与血管无明显关系。进入冠髓后含 SP 的神经纤维

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

开始分支，一些纤维从成牙本质细胞间穿过，进入前期牙本质和牙本质(图 7.2)。在人磨牙时，含 SP 神经进入前期牙本质后呈现不同的分布方式：一些纤维直接穿过前期牙本质进入牙本质；另一些纤维在前期牙本质中横向行走。鼠磨牙中，观察到含 SP 的神经可进入牙本质约 20μm。当切断下牙槽神经后，牙髓中含 SP 的神经纤维全部消失，但切除颈上神经节对其分布无任何影响，可以推论 SP 的神经纤维起源于三叉神经节。

(二) 降钙素基因相关肽(calcitonin gene - related peptide, CGRP)

1. CGRP 的生物学特性：

Craig RK, Hall L, Edbrooke MR 等(1981)发现人降钙素(calcitonin, CT)前体蛋白两侧存在着生物学意义未知的隐肽(cryptic peptide)。CT 基因可产生两种不同的信使核糖核酸(mRNA)，分别合成 CT 类激素和一种新肽，由于其来源和 CT 基因相关，故称为降钙素基因相关肽。Morris HR, Panico M, Etienne T 等(1984)和 Steenbergh PH, Hoppere JW, Zanberg J 等(1984)同时从人甲状腺髓样癌组织中分离出 CGRP，并利用快原子轰击质谱仪确定了它的氨基酸组成和顺序，这一工作不仅证实了 CGRP 的存在，而且进一步证明了人类也存在 CGRP。已知 CGRP 为 37 肽，其 N 端有一 2,7 双硫键，C 端有一酰胺基。在人类和大鼠均存在另一种形式的 CGRP，分别称为 αCGRP 和 βCGRP。

2. CGRP 在牙髓中的分布：

CGRP 是在牙髓中发现的另一种神经肽。含 CGRP 的神经纤维呈束状进入根尖孔，并分布于整个牙髓，一些纤维存在于成牙本质细胞下层，并穿入前期牙本质和牙本质中(图 7.3、7.4)。许多含 CGRP 的神经纤维围绕在血管周围，也有一些纤维束远离血管。切断下牙槽神经可导致牙髓中含 CGRP 的神经纤维完全消失，切除颈上神经节对其无影响，提示含 CGRP 的神经纤维起源于三叉神经节。

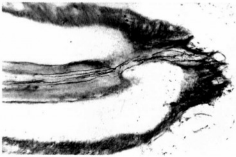


图 7.3　大鼠磨牙根尖孔和根髓
CGRP 阳性神经纤维　×25

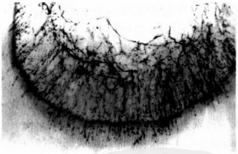


图 7.4　大鼠磨牙冠髓和牙本质中
CGRP 阳性神经纤维　×100

(三) 神经激肽 A (neurokinin A, NKA)

NKA 是最近在牙髓中发现的一种神经肽。NKA 和 SP 同属于速激肽类(tachykinin)，NKA 的前体和 SP 的某些前体相同。在整个牙髓中均可见到含 NKA 的神经纤维，其分布与含 SP 的神经纤维相似。切断下牙槽神经后，牙髓中含 NKA 的神经纤维全部消失，而切断肾上腺素能神经对其分布和数目无影响。因而含 NKA 的神经纤维也起源于三叉神经节。

CGRP 和 SP 的免疫双染色发现：二者的分布非常相似，可存在于同一神经纤维中。SP 和 NKA 的分布也十分相似，两种神经肽也可存在于同一神经纤维中。所以 SP、CGRP 和

NKA 三种神经肽似乎可存在于同一神经纤维中。

三、肾上腺素能神经中的神经肽

儿茶酚胺是肾上腺素能神经的神经递质。在牙髓中所有含儿茶酚胺的神经纤维都围绕在血管周围。多巴胺 β－羟基化酶(dopamine－beta－hydroxylase，DBH)是儿茶酚胺合成酶之一，DBH 的免疫组织化学染色显示：含 DBH 的神经纤维围绕在血管周围，但并非所有的血管都有含 DBH 的神经纤维围绕。近年来的研究发现：牙髓中含有神经肽 Y(neuropeptide Y，NPY)；含 NPY 的神经纤维和含 DBH 的神经纤维分布很相似；成牙本质细胞层未发现含 NPY 的神经纤维；切除一侧颈上神经节，则同侧牙牙髓中含有 NPY 的神经纤维全部消失，提示牙髓中含 NPY 的神经为肾上腺素能神经，起源于颈上神经节。研究还发现 DBH 和 NPY 共存于牙髓神经中。

四、副肾上腺素能神经中的神经肽

血管活性肠多肽(vasoactive intestinal polypeptide，VIP)是在哺乳动物牙髓中发现的一种神经肽。含 VIP 的神经纤维主要分布在血管周围，也有一些远离血管。有学者实验发现 VIP 免疫反应性纤维存在于成牙本质细胞下神经丛，并穿入成牙本质细胞层。VIP 和 SP 免疫双染色发现有些血管同时有含 VIP 的神经纤维和含 SP 的神经纤维伴行。切断下牙槽神经及肾上腺素能神经均不会影响牙髓中含 VIP 的神经。有报道副肾上腺素能神经节中有 VIP 存在，并且 VIP 可与乙酰胆碱共存于其他组织，故推测含 VIP 的神经纤维来源于副肾上腺素能神经节。

五、牙髓神经肽的生物学功能

牙髓神经肽的生物学功能主要表现在参与血流调节，参与疼痛传导，参与炎症和组织修复过程。

(一)参与血流调节

正常牙髓 SP 阳性神经纤维的分布与 CGRP 非常相似，只是前者较细而稀疏。牙髓中含有 SP、CGRP 的神经纤维都可能参与牙髓血流的调节，SP 有舒张血管作用，可增加毛细血管的通透性，导致血浆外渗，刺激单核细胞释放细胞因子和肥大细胞释放组胺。SP 对牙髓血流的调节作用可能是双向的，开始导致血流量增加，随后使血流量持续下降。CGRP 则可能是目前所发现的最强的一种血管扩张剂，它与神经源性炎症反应的血管通透性增加有关，它能增强缓激肽所致的增加血管通透性的作用，并促进 SP 神经激肽 α 和 β 的血管外渗作用。给下牙槽动脉内分别注入 SP 或 CGRP 后均引起了牙髓血管扩张，二者同时注入所引起的血管扩张要大于二者先后注入的叠加效应。利用超声多普勒观察牙髓血管在接受电刺激后的血流变化时，观察到牙髓血管扩张是由于 CGRP 和 SP 的释放，其中 CGRP 是主要因素。进一步的研究观察到短暂刺激引起的牙髓血管舒张主要是由 CGRP 调节，而长时间刺激引起的血浆外渗主要由 SP 和前列腺素调节。Luthman J，Luthman D，Hokfelt T 等(1992)研究发现，尽管含 SP 和 CGRP 神经纤维沿着血管的四周分布，但未见这些纤维进入血管的平滑肌层，因而 SP、CGRP 对牙髓血管作用机制目前仍不十分清楚。

(二)参与疼痛传导

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

炎症性痛过敏是一个由多种因素参与的复杂的病理生理过程。目前认为牙髓的痛觉感受器有 Aδ 纤维和 C 纤维的自由神经末梢。牙髓炎症性痛过敏主要是由于炎症或神经损伤后,局部组织释放多种体液介质作用于无髓神经纤维末梢,使其对刺激的反应性增强所致。其中一些重要的体液介质,如 BK、PGs 及吗啡等在发挥作用时,均与 Ca^{2+} 有密切关系。在研究人牙髓炎症性痛过敏状态下神经纤维内 Ca^{2+} 浓度变化时,直接测定了人牙髓炎症性痛过敏状态下牙髓神经纤维内 Ca^{2+} 的浓度,发现炎症性痛过敏的牙髓,其神经纤维内 Ca^{2+} 浓度均显著高于正常牙髓,推测牙髓神经纤维内 Ca^{2+} 浓度增加可能与其痛觉感觉器的炎症敏化过程有关,增加的 Ca^{2+} 可能来源于细胞外液 Ca^{2+} 的跨膜内流。因此,Ca^{2+} 在炎症性痛过敏中的作用是通过 Ca^{2+} 的跨膜通道内流而实现的。由于 Ca^{2+} 在细胞内的生物学效应主要是通过与钙调蛋白(Calmodulin, CaM)结合而发挥的,Ca^{2+} 在炎症性痛过敏的外周和中枢机制中是一个重要因素。

以角叉莱胶作为致炎物质,三叉神经脊束核尾侧亚核神经有无 C－fos 表达作为检测牙痛的客观指标,建立了牙髓神经急性痛过敏模型。结果无论是急、慢性炎症,牙髓中 SP 和 CGRP 均有明显增多,它们都参与了疼痛的传导。它们参与疼痛传导的机制可能是一方面 SP 和 CGRP 直接作用于神经纤维导致其胞膜去极化,感觉性升高;另一方面,SP 和 CGRP 有舒张血管的作用,使牙髓内压力持续升高,引起牙髓神经痛过敏。此外,由于 SP 和 CGRP 可相互加强其血管舒张作用,可在一定的外界刺激条件下使牙本质小管液向外渗出,根据牙本质痛觉传递的流体动力学说,分布于前期牙本质及牙本质的 SP 或 CGRP 神经纤维很可能参与了痛觉的传递。尤其在炎症过程中,一些炎症介质如组胺、5－羟色胺、缓激肽、前列腺素和神经肽等亦有可能通过降低 SP 和 CGRP 神经纤维的兴奋阈值而直接引起疼痛,或靠血管舒张和血浆外渗作用,使髓腔内压力增高而间接引起疼痛。采用放射免疫方法检测健康和伴有疼痛的人牙髓组织中 SP、神经激肽 A (neurokinin A, NKA)和 CGRP 的含量变化,发现 CGRP 在有疼痛和没有疼痛的牙齿中的含量均比 SP 和 NKA 高;有疼痛症状的牙齿比无症状的牙齿具有较高水平的 SP、NKA 和 CGRP,提示神经肽在牙髓炎症和疼痛过程中可能起重要作用。研究还显示 SP 在伴有疼痛的牙齿中的龈沟液中的含量比健康牙齿高得多,而去髓术后 1 周 SP 明显下降,提示 SP 在炎性牙痛的发病中具有重要意义。

目前已知牙髓炎症时组织不仅产生缓激肽(BK)等内源性致痛物质,还可产生脑啡肽(EK)等内源性镇痛物质。总之 SP 或 CGRP 神经纤维是代表牙髓内感觉神经纤维的一个亚群,除了具有感觉功能外,还具有重要的输出功能,在牙髓组织内可起到双向的调节作用。

(三)参与炎症过程

SP 和 CGRP 在受到刺激后可从其神经末端释放出来,启动或调节炎症过程,参与炎症介导。例如当牙髓受到各种理化因素的刺激,如导致髓腔内的压力增高时则是以激活牙髓中的 C 纤维 ,引起 SP、CGRP 等神经肽的释放而对牙髓的炎症过程产生影响。同时,牙髓的 C 纤维还可被一些炎症介质如缓激肽和组胺等所激活。这样在不同刺激作用下,神经肽源性的感觉神经纤维即可释放 SP、CGRP 等神经肽进入组织,从而引起重要的输出作用,在牙髓中可能参与即刻的防御反应。研究还发现,淋巴细胞表面具有与 SP 特异性结合的受体。SP 与受体结合后可促进 T 淋巴细胞的增殖。Park SH, Hsiao GY, Huang GT(2004)研究证实,在神经源性的炎症反应中,SP 可通过诱导牙髓细胞表达 IL－8 和单核细胞趋化蛋白 1 (MCP－1)来促进白细胞浸润,它对 IL－8 的诱导作用强于 MCP－1。Patel T, Park SH, Lin

LM 等(2003)比较了 SP 和 CGRP 刺激牙髓成纤维细胞后 IL－8 的表达水平,发现 10^{-8}～10^{-4}mol/L 的 SP 可明显上调 IL－8,而 CGRP 则无此作用,且二者也无协同诱导作用。SP 还可加强巨噬细胞的吞噬活性和多形核白细胞的趋化性,以启动和调节炎症过程。Moore 等把 SP 输入到绵羊的淋巴结中,发现该淋巴结输出小淋巴细胞和淋巴母细胞增多,认为 SP 具有免疫促进效应。在牙髓受到各种理化因素刺激或暴露于口腔之后,则可能由免疫防御发展到免疫病理损害。

在龋病牙髓中,当牙齿发生浅龋时,成牙本质细胞出现轻微损害,牙髓组织内有少量炎细胞渗出,同时 SP、CGRP 神经纤维亦发生数目增多、染色加深的相应变化;中龋时,成牙本质细胞进一步受累,牙髓组织内有较多的炎细胞渗出,SP、CGRP 神经纤维明显增多,染色加深和增强,并在龋病下方的成牙本质细胞层形成明显的神经丛,有许多细小的分支越过成牙本质细胞层向着龋病方面延伸,表明此阶段的 SP、CGRP 神经纤维的反应性变化极为明显,此种反应性增强变化导致了大量的 SP 免疫反应性(SP－IR)和 CGRP 免疫反应性(CGRP－IR)物质释放进入牙髓组织内。

曹志中(1995)利用从大鼠磨牙殆面露髓、封入 1% 角叉莱胶建立大鼠急性牙髓炎模型,在大鼠磨牙殆面制备近髓窝洞、封入新鲜龋坏组织建立大鼠慢性牙髓炎模型。通过免疫组织化学方法观察了牙髓炎症状态下 SP、CGRP 阳性神经纤维的动态变化。实验证实:急性炎症时,牙髓中 SP、CGRP 阳性神经纤维显著增多(图 7.5、7.6),CGRP 并向冠髓大量释放,吗啡有抑制 CGRP 释放的作用。慢性炎症不同阶段牙髓中 SP、CGRP 阳性神经纤维均有增多,炎症早期进入牙本质小管的阳性纤维增多,后期根髓阳性纤维出现出芽现象,尖周膜腔阳性纤维显著增多,尖周脓肿形成时,大量阳性神经纤维围绕于脓肿周围(图 7.7～7.12)。刘军(1995)研究发现人牙浅龋、中龋、深龋和牙髓炎时,SP、CGRP 阳性神经纤维增多,在有脓肿形成的病例中可见其在脓肿周围大量聚集并包绕脓肿。Bowles WR, Withrow JC, Lepinski AM 等(2003)运用生化方法测量人牙髓炎患牙的牙髓 SP 水平,证实炎症牙髓中 SP 的表达显著高于正常牙髓。Caviedes－Bucheli J, Camargo－Beltran C, Comez－La－Rott AM 等(2004)分析了急性炎症牙髓和健康牙髓的 CGRP 表达水平,发现二者存在显著的差异,支持了 CGRP 参与并调节牙髓炎症反应的假说。

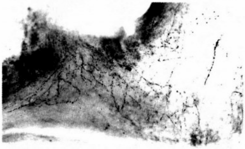


图 7.5　急性炎症冠髓 SP 阳性神经纤维　×50

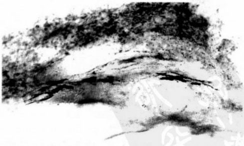


图 7.6　急性炎症根髓 SP 阳性神经纤维　×50

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

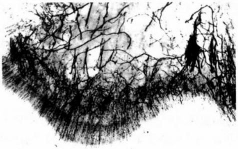


图 7.7　慢性炎症早期冠髓 CGRP 阳性纤维增多、深染　×50

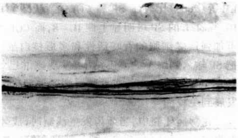


图 7.8　慢性炎症早期根髓 CGRP 阳性纤维增多、深染　×50

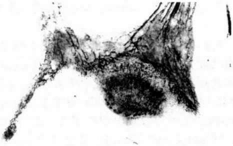


图 7.9　慢性炎症后期冠髓 CGRP 阳性神经纤维围绕于脓肿周围　×25

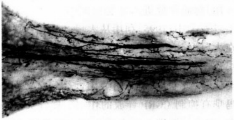


图 7.10　慢性炎症后期根髓 CGRP 阳性纤维增多并出现大量分支　×50

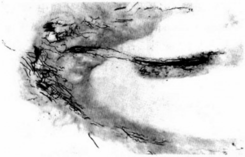


图 7.11　慢性炎症晚期尖周膜腔增宽，CGRP 阳性纤维增多　×25

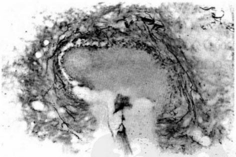


图 7.12　慢性炎症晚期尖周脓肿形成，大量 CGRP 阳性纤维围绕于其周围　×25

国外一些学者也发现：随着龋病的发展，人牙髓中 SP、CGRP、NKA、VIP、NPY 含量逐渐升高，并且有疼痛史的深龋患牙牙髓中 SP 含量较无症状深龋患牙牙髓中 SP 含量有显著增加。Okiji T，Jontell M，Belichenko P 等（1997）发现，大鼠牙髓中成牙本质细胞层下区 70% 以上的Ⅱ型抗原表达细胞与 SP 阳性神经纤维接近；体外实验还发现 10^{-9} ~ 10^{-7}mol/L 的 SP 可显著地促进 T 淋巴细胞的增殖，10^{-7}mol/L 的 CGRP 可抑制 T 淋巴细胞的增殖。Haug SR，Berggreen E，Heyeeraas，KJ 等（2001）发现 NPY 阳性神经纤维对牙髓中免疫细胞具有营养作

用，肾上腺能神经失衡可引起牙髓炎症和疼痛。Uddman R，Kato J，Lindgren P 等（1999）在人牙髓中发现 CGRP1 受体的 mRNA 的存在。实验还发现，CGRP 可刺激 BMP－2 的合成。以上结果提示 SP、CGRP 与牙髓、牙周膜炎性痛过敏发生及炎症、修复过程密切相关，并证实牙髓炎症在很大程度上是由神经介导的。由此可见，牙髓中的神经纤维不单有向中枢传导痛觉信息的传入功能，还有传出功能，即通过末梢神经肽的释放主动参与了牙髓对伤害性刺激的反应。

（四）参与损伤修复

SP、NKA 和 CGRP 对体外培养的大鼠牙髓成纤维细胞具有促进增殖作用，提示它们可能参与牙髓的损伤愈合过程。另外 Taylor PE，Byer's MR（1990）研究发现，鼠牙髓轻度损伤后，在未见炎细胞浸润或结缔组织明显损害之前，损伤区的下方即可见 CGRP 神经纤维的生长，表明感觉性神经纤维的生长是牙髓对损伤作出反应的一个重要环节。而中度损伤后 4 d，牙髓血管扩张，出现急性炎症，损伤区周围的 CGRP 神经纤维数量随之增加。损伤后 7 d，急性炎症已不明显，损伤区边缘修复性牙本质开始形成，其周围亦有大量的含 CGRP 神经纤维分布。11～35 d，损害区逐渐被修复性牙本质代替，CGRP 的分布亦逐渐接近正常，CGRP 神经纤维沿着正在愈合的损伤部位边缘和修复性牙本质四周分布。机械的和感染性的损伤对鼠磨牙牙髓腔内 SP、CGRP 神经纤维影响的研究表明，牙髓中的 SP 、CGRP 的含量可因受不同的损伤而发生变化，它们的反应不是一成不变的，而是根据损伤的类型和程度的不同而不同。

Krinnsland I，Heyeraas KJ，Byers MR（1991）在移植牙的实验中发现，牙齿移植后，CGRP、SP 神经纤维的再生是与纤维结缔组织的再生以及牙髓、牙周组织修复同时发生的。术后在不能形成修复性牙本质的移植牙中，其根髓未见正常的神经血管束形成，含 CGRP 神经纤维数量也明显减少，表明新生牙髓中含 CGRP 神经纤维的数量与组织形成修复性牙本质的能力有关。

牙齿是具有活力和新陈代谢的器官，且与机体有着密切的联系，因此，在龋病的发生、发展过程中，始终存在着破坏和修复的交替过程。其中，牙髓内的 SP、CGRP 神经纤维在牙髓中起到双向调节作用，它们在受到刺激后可以从其终末端释放出来，将信息传递到中枢，启动或调节炎症过程，同时又参与组织的修复。由此可见，龋病牙髓中的 SP、CGRP 神经纤维是处于动态变化之中，此动态变化是它们参与牙髓防御反应或炎症反应的象征，因而进一步为牙髓炎症在很大程度上是神经源性所介导的炎症提供了依据。关于牙髓中神经肽的生物学作用，以及它们在牙髓损伤、炎症和修复过程之间的相互作用及作用机制等尚需深入研究。

与此同时，在临床应用方面，是否可采用缓慢释放神经肽的作用性药物作为深龋衬里的一部分，或作为直接或间接盖髓药物的一个组成部分，调节神经肽对组织损伤的反应，以便为治疗牙髓损伤提供一种新的方法仍需进一步研究。

（文玲英，曹志中）

第八节　牙髓的神经生长因子－神经生长因子受体系统

神经生长因子（nerve growth factor ，NGF）是目前了解最多的神经营养因子，它的发现和

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

提纯对神经生物学的发展是一个重要贡献。NGF 通过与其受体(nerve growth factor receptor，NGFR)结合而产生生物学效应。NGFR 有两种类型,高亲和性 NGFR 和低亲和性 NGFR,两种 NGFR 在结构上的区别现在尚不清楚。

一、NGF 的合成和作用

大量的研究表明 NGF 主要是在神经所支配的靶组织内合成,但这种合成是如何调控的目前所知甚少。在成年动物,肾上腺素能神经和感觉神经的分布密度与靶组织中 NGF 和其 mRNA 的水平呈正相关。通过免疫方法在外周神经中也可检测到 NGF,但 NGF 和其 mRNA 水平都很低。由此可以推论,外周神经中的 NGF 是由靶组织中的 NGF 经轴突逆向运输而来,而不是神经周围的非神经元成分产生的。靶组织 NGF 的生成似乎不受神经支配的影响。有趣的是,靶组织中 NGF 的生成减少似乎与三叉神经节细胞的自然死亡阶段一致,这种现象提示神经元的死亡与它们相互间争夺神经营养分子有关。

在发育阶段,外周神经中发现较高含量的 NGF 和其 mRNA,提示在此阶段雪旺细胞等非神经元成分参与了 NGF 的合成。切断发育成熟动物的外周神经可刺激雪旺细胞,使其恢复生成 NGF 和 NGFR 的功能。非靶细胞 NGF 的合成明显地受到白介素 - 1 的调控。

给予啮齿动物药理学剂量的 NGF 可大大增加神经节细胞的体积,促进轴突和树突分支。牙髓炎晚期根髓神经纤维的大量分支可能与 NGF 有关。此外,NGF 还可引起神经节细胞递质酶和肽的合成增多。一般认为,靶细胞生成的 NGF 与神经末梢表面 NGFR 结合,形成 NGF - NGFR 活性复合物,并沿轴突逆向运输至神经元胞体,通过未知的第二信使影响转录过程,从而产生一系列生物学效应。

二、牙髓中 NGFR 的分布和生物学意义

Freid K 和 Risling M(1991)利用免疫组织化学方法研究猫乳牙、恒牙牙髓中 NGFR 的分布发现:无论是乳牙还是恒牙牙髓均有大量的 NGFR 阳性神经;轴突和雪旺细胞似乎都有免疫标记;乳牙牙髓中,大量血管管壁呈免疫阳性反应,而恒牙牙髓中这种现象极少见;恒牙牙髓中,多数 NGFR 阳性神经呈 CGRP 样免疫反应,很多 NGFR 阳性神经呈 SP 样免疫反应,而 NPY 阳性神经则无 NGFR 样免疫反应;与恒牙相比,乳牙牙髓中较少的 NGFR 阳性神经同时呈 SP 样免疫反应或 CGRP 样免疫反应,啮齿动物组织中的雪旺细胞只有发育阶段或轴突切断后才有 NGFR 表达。正常猫牙牙髓中雪旺细胞表面 NGFR 的作用还不清楚,因为雪旺细胞本身对 NGF 并无反应。事实上,有关 NGF 对牙髓神经纤维的作用现在所知甚少。牙髓中大量的 NGFR 阳性神经存在这种现象提示 NGF 以某种方式影响着牙髓神经。虽然在发育中的乳牙牙髓可见大量的 NGFR 样免疫反应,但没有理由认为 NGF 对牙髓神经有导向作用。有学者发现三叉神经节感觉神经元在发出轴突进入靶组织时并无 NGFR 表达。现在,大多数学者认为 NGF 可能与牙髓神经纤维活力维持关系密切,而不仅仅影响牙髓神经的生长发育。有实验证据表明初级感觉神经元神经肽的合成有赖于 NGF。肾上腺素能神经节神经元活力的维持也依赖于 NGF,但出生后这种依赖作用显著下降。

正常成年大鼠磨牙牙髓一些特定的成纤维细胞有大量的 NGF 和低亲和性 NGFR 表达,这些成纤维细胞聚集在成牙本质细胞附近。成纤维细胞低亲和性 NGFR 的表达似乎依赖于成牙本质细胞,因为成牙本质细胞随着增龄退变时,成纤维细胞的 NGFR 样免疫反应消

失；在受到伤害性刺激的成牙本质细胞下面，成纤维细胞 NGF 生成增多，而 NGFR 表达下降。

大鼠磨牙的再植实验发现：再植牙牙髓神经再生是否成功与低亲和性 NGFR 样免疫反应性成纤维细胞的出现没有关系；在再植 7～10 d 牙髓已坏死的标本中发现有细胞外 NGFR 样免疫反应；再生的神经未必位于成牙本质细胞或 NGFR 样免疫反应性成纤维细胞附近；再植后 7～10 d 一些再生良好的牙髓在冠髓中央区可见大量的低亲和性 NGFR 样免疫反应性成纤维细胞，与发育期的牙髓相似，这种变化可能是牙髓再生的基本过程；雪旺细胞 NGFR 表达增多，并形成“空管”围绕于无髓或有髓神经纤维碎片周围，这些变化可能对牙髓神经的再生是非常重要的。当切断下牙槽神经使牙髓去神经支配时，成牙本质细胞和成纤维细胞形态、NGF 及 NGFR 表达不变，神经再生良好，雪旺细胞中 NGFR 及其 mRNA 增多。随着增龄，最初的柱状成牙本质细胞被立方形成牙本质细胞代替，其下方的 NGFR 样免疫反应性成纤维细胞减少。

（曹志中）

参考文献

1. Olson L. Outgrowth of sympethetic adrenergic neurons in mice treated with a NGF. Z Zellforsh Mikrosk Anat. 1967;81:155
2. Stockel K, Solomon F, Paravcini U, et al. Dissociation between effects of NGF on tyrosine hydroxylase and tubulin synthesis in sympathetic ganglia. Nature. 1974;250:150
3. Olgart L, Hokfelt T, Nilsson G, et al. Localization of SP – like immunoreactivity in nerves in the tooth pulp. Pain. 1977;4:153
4. Tonder KH, Nass G. Nervous control of blood flow in the dental pulp in dogs. Acta Physiol Scand. 1978;104:13
5. Lilja J. Innervation of different parts of the predentin and dentin in young human premolars. Acta Odontol Scand. 1979;37:339
6. Kessler JA, Black IB. NGF stimulates the development of substabce P in sensory ganglia. Proc Natl Acad Sci USA. 1980;77:649
7. Avery JK, Cox CF, Chiego DJ. Presence and location of adrenergic nerve endings in the dental pulp of mouse molars. Anat Rec. 1980;198:59
8. Mattews B, Robinson PP. The course of postganglionic sympathetic fibers distributed with the trigeminal nerve of the cat. J Physiol. 1980; 303:391
9. Fried K, Hildebrand C. Pulpal axons in developing, mature and aging feliner permanent incisors. A study by electron microscopy. J Comp Neuro. 1981; 203:23
10. Byers MR, Mattews B. Autoradiographic demonstration of ipsilateral and contralateral sensory nerve ending in cat dentin, pulp and periodontium, Anat Rec. 1981;201:249
11. Fried K, Hildebrand C. Developmental growth and degeneration of pulpal axons in feline primary incisors. J Comp Neurol. 1981;203:37
12. Narhi M, Virtanen A, Huopaniemi T et al. Conduction velocities of single pulp nerve fiber units in the cat. Acta Physiol Scand. 1982;116:209
13. Gunji T. Morphological research on the sensitivity of dentin. Arch Histol Jpn. 1982;45;45
14. Craig RK, Hall L, Edbrooke MR, et al. Partial nucleotide sequence of human calcitonin precursor mRNA identifies flanking cryptic peptides. Nature. 1982 Jan 28;295(5847):345

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

15. Mohamed S, Atkinson ME. A histological study of the innervation of develaping mouse teeth .J Anat. 1983; 136:735
16. Johnson DC, Harshbarger J, Pymer HD. Quantitative assessment of neural development in human premolars . Anat Rec. 1983; 205:421
17. Gunji T, Gunji K, Hoshino M, Takeuchi K, Kobayashi S. Morphological change of pulal nerves with advancing years. Jpn J Oral Biol. 1983; 25:503
18. Zimmerman A, Sutter A. NGFR on glial cells. Cell – cell interaction between neurons and Schwann cells in cutures of chick sensory ganglia . EMBO J. 1983;2:879
19. Uddman R, Grunditz J, Sundler F. Neuropeptide Y: occurrence and distribution in dental pulp. Acta Odontol Scand. 1983;42:361
20. Lundberg JM, Hokfelt T. Coexistence of peptides and classical neurotransmitter. Trends Neurosci. 1983;6: 325
21. Hirvonen IJ, Narhi MVO, Hakumaki MOK. The excitability of dentin surface . J Endodon. 1984;10:294
22. Wakisaka S, Ichikawa H, Nishimoto T, et al. Substabce P – like immunoreactivity in the pulp – dentin zone of human molar demonstrated by indirect immunofluorescence, Arch Oral Biol. 1984;29:73
23. Morris HR, Panico M, Etienne T,et al. Isolation and characterization of human calcitonin gene – related peptide. Nature. 1984 Apr 19 – 25;308(5961):746
24. Steenbergh PH, Hoppener JW, Zandberg J,et al. Calcitonin gene related peptide coding sequence is conserved in the human genome and is expressed in medullary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab. 1984 Aug;59(2):358
25. Shelton DL, Reichardt LF. Expression of the B nerve growth factor gene correlates with density of sympathetic innervation in effector organs. Proc Natl Acad Sci USA. 1984;81:7951
26. Edwall B, Gazelius B, Fazekas A, et al. Neuropeptide Y(NPY)and sympathetic control of blood flow in oral mucosa and dental pulp in the cat . Acta Physisol Scand. 1985; 125:253
27. Narhi MVO. The characteristics of intradental sensory units and their responses to stimulation. J Dent Res. 1985;64(Spec Iss):564
28. Korsching S, Auburger G, Heumann R, et al. Levels of nerve growth factor and its mRNA in the central nervous system of the rat correlate with cholinergic innervation . EMBO J. 1985;4:139
29. Johnson DC, Innervation of teeth :qualitative ,quantitative , and developmental assessment . J Dent Res. 1985;64:555
30. Trowbridge HO. Intradental sensory units: physiological and clinical aspects . J Endodon. 1985;11:489
31. Olgart LM. The role of local factors in dentin and pulp in intradental pain mechanisms. J Dent Res. 1985; 64 (Spec Iss):572
32. Bilotto G, Markowitz K, Kin S. Intradental nerve activity in response to inoic and non – ionic solutions. J Dent Res. 1986;65(Spec Iss):386(abstract).
33. Uddman R, Grunditz T, Sundler F. Calcitonin gene – related peptide: a sensory transmitter indental pulp? Scand. J Dent Res. 1986;94:219
34. Taniuchi M, Clark HB, Johnson EM Jr. Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy . Proc Natl Acad Sci USA. 1986;83:4094
35. Ahlquist ML, Franzen OG, Edwall LGA, et al. The relation between intradental nerve activity and pulpal pain after heat stimulation. Acta Physiol Scand. 1986;127:1
36. Valentino KL, Tatemoto K, Hunter J, et al. Distribution of neuropeptide K – immnuoreactivity in the rat cental nervous system. Peptides. 1986;7:1043

37. Bilotto G, Markowitz K, Kin S. Experimental procedure to test the efficacy of chemical agents in altering intradental nerve activity . J Endodon. 1987;13:458

38. Jyvasjarvi E, Kniffki KD. Cold stimulation of teeth:a comparison between the responses of cat intradental Aδ and C fibers and human sensation . J Physiol. 1987;391:193

39. Wakisaka S, Ichikawa H, The distribution and origin of CGRP – containing nerve fibers in feline dental pulp. Histochemistry. 1987;86:65

40. Heumann R, Korsching S, Bandtlow C, et al. Changes of nerve growth factor systhesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection. J Cell Biol. 1987;104;1623

41. Whittemore SR, Larkfors L, Ebendal T, Increased B – nerve growth factor mRNA and protein levels in neonatal rat hippocampus following specfic choligernic lesions. J Neurosci.1987;7:244

42. Davies AM, Bandtlow C, Heuman R, et al. Timing and site of nerve growth factor synthesis in developing skin in relation to innervtion and expression of the receptor . Nature. 1987;326:353

43. Heumann R, Lindholm D, Babdtlow C, et al. Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development , degeneration and regeneration, role of macrophage. Proc Natl Acad Sci USA. 1987;84:8735

44. Lindholm D, Heuman R, Meyer M, et al. Interleukin – 1 regulates systhesis of NGF in non – neuronal cells of rat sciatic nerve . Nature. 1987;330:658

45. Davies AM, Bandtlow C, Heumann R, l et al. Timing and site of NGF synthesis in developing skin in relation to innervation and expression of the receptor. Nature. 1987;326 :353

46. Narhi MVO, Hirvonen T. The response of dog intradental nerves to hypertonic solutions of $CaCl_2$ and NaCl, and other stimuli, applied to exposed dentine. Archs Oral Biol. 1987;32:781

47. Gazelius B, Edwall B, Olgart L, et al. Vasodilatory effects and coexistence of calcitonin gene – related peptide (CGRP)and substance P in sensory nerves of cat dental pulp. Acta Physiol Scand. 1987;130:33

48. Silverman JD, Kruger L. An interpretation of dental innervation based upon the pattern of calcitonin gene – related peptide (CGRP) – immunoreactive thin sensory axons. Somatosens Res. 1987;5:157

49. Wakisaka S, Ichikawa H, Nishicawa S, et al. Immunohistochemical observation on the correlation between substance P and vasoactive intestinal polypeptide – like immunoreactivities in the feline dental pulp . Arch Oral Biol. 1987;32:449

50. 韩中胜. 神经信息物质. 神经解剖学杂志. 1988;4:15

51. Snider WD, NGF enhances dendritic arbor:zation of sympathetic ganglion cells in developing mamals. J Neurosci. 1988;8:2628

52. Taniuchi M, Clark HB, Schweitzer JB, et al. Expression of NGFR by Schwann cells of axotomized peripheral nerves:ultrastructural location, supression by axonal contact , and binding properties. J Neurosci. 1988; 8:664

53. Jyvasjarvi.E, Kniffki KD. Afferent C fiber innervation of cat pulp: confirmation by electrophsiological methods. J Physiol. 1989; 411:663

54. Lindsay RM, Harmar AJ. Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. Nature. 1989;337:362

55. Snider WD, Johnson EM Jr. Neurotrophic Molecules. Ann Weurol . 1989;26:489

56. Wakisaka S. Neuropetides in the dental pulp :distribution ,origins ,and correlation . J Endodon.1990;16:67

57. Kim S. Neurovascular interactions in the dental pulp in health and inflammation . J Endodon. 1990; 16:48

58. Wakisaka S. Neuropeptides in the dental pulp: distribution , origins , and correlation . J Endodon. 1990; 16:67

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

59. Casasco A, Calligaro A, Casasco M. et al. Peptidergic nerves in human dental pulp. Histochemistry. 1990; 95:115
60. Byers M, Taylor P, Khayat B, et al. Effects of injury and inflammation on pulpal and periapical nerves . J Endod. 1990;16:78
61. Byers MR. Segregation of NGF receptor in sensory receptors, nerves and local cells of teeth and periodontium demonstrated by EM immunocytochemistry. J Neurocytl. 1990;19:765
62. Byers MR, Schatteman GC, Bothwell M. Mutiple functions for NGF receptor in developing, aging and injured rat teeth are suggested by epithelial, mesenchymal and meura limmunoreactiuty. Deveopment. 1990;109:461
63. Taylor PE, Byers MR. An immunocytochemical study of the morphological reaction of nerves containing calcitonin gene – related peptide to microabscess formation and healing in rat molars. Arch Oral Biol. 1990;35(8):629
64. Freid K, Risling M. NGFR – like immunoreactivity in primary and permanent canine tooth pulps of the cat. Cell Tissue Res. 1991;264:321
65. Kvinnsland I, Heyeraas KJ, Byers MR. Regeneration of calcitonin gene – related peptide immunoreactive nerves in replanted rat molars and their supporting tissues. Arch Oral Biol. 1991;36(11):815
66. Aghabeigi B. The pathophysiology of pain. Br Dent J. 1992;173:91
67. Inoue H, Kurosaka Y, Abe K. Autonomic nerve endings in the odontoblast/predentin border and predentin of the canine teeth of dogs. J Endodon. 1992;18:149
68. Kerezoudis NP, Olgart L, Edwall L, et al. Activation of sympathetic fibers in the pulp by electrical stimulation of rat incisor teeth . Archs Oral Biol, 1992;37:1013
69. Ciarlone AE, Pashley DH. Medication of the dental pulp :a review and proposals. Endod Dent Traumatol. 1992;8:1
70. Luthman J, Luthman D, Hokfelt T, Occurence and distribution of different neurochemical markers in the human pulp. Archs Oral Biol. 1992;37:193
71. Byers MR, Wheeler EF, Bothwell M. Altered expression of NGF and p75 – NGF – receptor by fibroblasts of injured teeth precedes sensory nerve sprouting. Growth Factors. 1992;6:41
72. Byers MR, Kvinnsland I, Bothwell M. Analysis of low affinity NGFR during pulp healing and regeneration of myelinated and unmyelinated axons in replanted teeth. J Comp D Neurol. 1992;326:470.
73. 彭彬. 白三烯与牙髓炎. 国外医学口腔医学分册. 1993;20:1
74. 刘军. 正常及龋病牙髓中 SP 与 CGRP 的分布特征和动态变化研究. 硕士研究生学位论文. 西安:第四军医大学. 1995;17 ~ 23
75. 曹志中. 牙髓炎性痛过敏机制的实验研究. 博士研究生学位论文. 西安:第四军医大学. 1995;38 – 51
76. Okiji T, Jontell M, Belichenko P, et al. Structural and functional association between substance P – and calcitonin gene – related peptide – immunoreactive nerves and accessory cells in the rat dental pulp. J Dent Res. 1997 Dec;76(12):1818
77. Uddman R, Kato J, Lindgren P, et al. Expression of calcitonin gene – related peptide – 1 receptor mRNA in human tooth pulp and trigeminal ganglion. Arch Oral Biol. 1999 Jan;44(1):1
78. Haug SR, Berggreen E, Heyeraas KJ. The effect of unilateral sympathectomy and cavity preparation on peptidergic nerves and immune cells in rat dental pulp. Exp Neurol. 2001 May;169(1):182
79. Patel T, Park SH, Lin LM, et al。 Substance P induces interleukin – 8 secretion from human dental pulp cells. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003 Oct;96(4):478 – 485.
80. Bowles WR, Withrow JC, Lepinski AM, et al。 Tissue levels of immunoreactive substance P are increased in

patients with irreversible pulpitis. J Endod. 2003 Apr;29(4):265 - 467.

81. Caviedes - Bucheli J, Camargo - Beltran C, Gomez - la - Rotta AM, et al。 Expression of calcitonin gene - related peptide (CGRP) in irreversible acute pulpitis. J Endod. 2004 Apr;30(4):201 - 204.

82. Park SH, Hsiao GY, Huang GT. Role of substance P and calcitonin gene - related peptide in the regulation of interleukin - 8 and monocyte chemotactic protein - 1 expression in human dental pulp. Int Endod J. 2004 Mar;37(3):185 - 192.

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

第八章　牙髓微生物学

口腔与外部环境相通，而且口腔内各个器官常处于含氧条件不足的状态下。由于这些特征，口腔的常住菌群繁多。据目前所知，口腔有多达350多个菌属（群），而且在这些口腔菌群中，厌氧和兼性厌氧性细菌占了大多数。口腔常住菌群与口腔之间通常是相互受益的关系。一方面，作为这些菌群的宿主，口腔为其提供了丰富的营养，同时，口腔中的温度、湿度、各类软组织和硬组织提供的复杂生态环境，形成各种不同类型的氧化还原电势（Eh），适合于需氧菌、兼性厌氧菌和专性厌氧菌等对氧有不同需求的细菌生长，各种类型的软组织与硬组织提供的复杂生态环境，导致口腔各部位的微生物群体差异很大，如牙面沟裂、牙齿邻面、口腔黏膜表面以及牙龈沟等都有不同的菌群分布。另一方面，定居于口腔中的菌群可以制造一些人体必需的维生素和蛋白质，而且这些微生物可作为抗原刺激物使人体产生抗体，以对付进入口腔的非常住菌群、有害菌，并能促进人体一些器官的正常发育。同时，菌群之间的生态平衡也有利于维护人体的健康状态。但是这些菌群并非完全无害，许多口腔疾病如龋病、牙髓病、尖周病和牙龈炎等就是由天然菌群所致。而不同的菌群，在口腔疾病发生过程中分别起着不同的作用。一般情况下，细菌所需的微生态环境的条件严格与否，影响着细菌的表型变化、毒力强弱以及流行病学调查中对其的检出率。

关于细菌在牙髓病和根尖周病中的作用的研究由来已久，早在1890年，Miller就在病变的人牙髓组织中鉴定出细菌的存在，Kakehashi（1965）经典实验又进一步证实了细菌在牙髓病中的绝对重要性。他们将无菌鼠和普通鼠牙髓暴露于口腔环境作对照观察，结果发现无菌鼠除实验性创伤外，并未引起牙髓损伤，而普通鼠却发生了牙髓坏死和根尖周病变，从而为明确细菌感染与牙髓炎症之间的关系提供了有力依据。

早期对感染根管微生物学的研究，显示根管内主要检出菌为需氧菌和兼性厌氧菌，优势菌通常是链球菌、微球菌和乳酸杆菌等，20世纪70年代以后，随着厌氧培养技术的发展，大量的G^-厌氧菌被鉴定出来。目前一般认为，感染根管内是以厌氧菌为主，同时具有兼性厌氧菌和需氧菌的混合感染。

第一节　感染根管内厌氧菌的分离、培养和鉴定

厌氧菌的分离培养技术是逐渐提高和完善的。20世纪70年代以前用焦性没食子酸法或单纯用硫乙醇酸盐培养基等传统方法分离培养厌氧菌，其厌氧菌的检出率仅为3%左右，以后经多年的努力，从厌氧培养的装置、培养基的成分到分离转管的步骤等多方的改进，使厌氧菌的检出率逐步提高（表8.1）。

表 8.1　厌氧菌分离手段和检出率变化过程表

检测、分离方法	检出率(%)
单纯用硫乙醇酸盐培养基	3
厌氧缸	9
改离厌氧瓶	15
厌氧气袋缸	26
预还原培养基,无氧气体连续充气	35
无氧送样管 + 预还原培养基 + 厌氧手套箱	38
椅旁或床边接种 + 选择性培养基	58.5

一、厌氧标本的采集操作程序和选择厌氧培养基的原则

(一)采集操作程序

口腔存在着各不相同的生态部位,如舌、咽、黏膜、牙齿、牙周袋等,即使在单个牙上也存在几种微生态环境不同的部位。微生态环境的不同,优势菌丛的分布就有所不同,同样,不同部位的标本采集方法也各不相同。与牙髓学相关的标本采集则是从封闭的感染根管内取样,其操作步骤如下:

1.先用球钻去除洞内表层的感染组织如软龋等,流水冲洗,隔湿。

2.用 3%碘酊消毒,然后再用 10%硫代硫酸钠液还原碘,吸干。

3.用无菌牙钻开髓,揭去髓室顶。

4.用注射器(针头上应插上橡皮头)将预还原的转管培养液注入根管内。

5.用无菌扩孔钻插入根管,搅动根管内的液体。

6.用无菌纸捻吸干髓室和根管口培养液后,再用纸捻插入管内吸取根管内液体,剪弃纸捻尖端少许,立即放入含 0.5 ~ 1 mL 预还原转管液的小瓶或试管中,震荡或超声均浆化,并立即送检培养。

(二)选择厌氧培养基的原则

1.培养基在接种以前,必须处于无氧状态,使培养基表面的氧化还原电势(Eh)下降,否则厌氧菌难以生长。

2.培养基的营养要丰富。

3.培养平板应新鲜配制,尤其是做初代培养时更应如此。

4.预还原时间应在无氧环境下 24 ~ 48 h。

由于机体组织与人工制成的培养基的环境差异很大。因此,初代培养往往较为困难,要求也更为严格。对厌氧菌而言,除了应尽快建立一个无氧环境外,营养条件、生长条件也十分重要,所以应使用选择性培养基。因为即使营养条件适合,由于某些细菌之间的相互竞争,甚至相互抑制,可使一些厌氧菌不能生长,如梭杆菌、类杆菌,若与链球菌、韦永球菌和类白喉杆菌混合培养时,由于后者生长迅速,相互竞争营养,以及后者的代谢产物对前者有害,而起到抑制作用,使梭杆菌、类杆菌并不能生长或使它们死亡。因此厌氧菌的分离培养一般要用选择性培养基或鉴定培养基。

二、分离、鉴定过程

(一)分离

第一天,接种采集的标本经均浆混合后,分别接种普通需氧平板、厌氧血平板、液体培

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

养小瓶或试管以及直接染色镜下观察。需氧平板置普通温箱孵育,厌氧平板厌氧培养。

第二天,取出需氧平板做需氧菌的分离鉴定。

第三天,取出厌氧菌培养板,做菌落的表面性状记录,编号标记,挑选分纯菌落,做需、厌氧培养和涂片观察,并记录观察结果。

第四天,观察需、厌氧培养结果,如需、厌氧培养均有菌生长则为兼性厌氧菌,如只有厌氧培养中有菌生长,说明有专性厌氧菌,依次类推。然后做生化试验分类鉴定,同时再做需、厌氧培养,目的是证实无污染,使生化试验结果可靠,并可证实是否为专性厌氧菌。

(二)鉴定

较为严谨的分析方法是采用三级鉴定法进行逐步分析:

1. 一级鉴定:

即从临床标本到分纯培养之间的分离鉴定过程。在这段时间里,可根据培养的细菌的形态特征,作初步的观察和分类(表 8.2)。

表 8.2 一级鉴定中一些细菌的性状线索表

革兰染色	菌落特征	可能的菌属
G^- 杆菌	①在 BBE 平皿上呈灰黑色,周围有黑色的"晕"	脆弱类杆菌
	②有①的特征;用波长约为 366nm 紫外灯照射有砖红色荧光者;	产黑色素普菌
	在卡那万古溶血平皿上呈棕色或紫色菌落	卟啉菌
	③菌落渗入琼脂内,使培养基表面留有小坑	纤维弯曲菌
		解脲普菌
	④表面有斑点	具核梭杆菌
G^- 球菌	⑤菌落小,不透明,排列成比,短链状,菌体小	韦荣球菌
G^+ 球菌	⑥镜下排列成长短不等的链状	(消化)链球菌
G^+ 杆菌、无芽孢	⑦菌落呈锯臼齿形,表面粗糙,镜下有黄色颗粒,菌体带有明显的丝状体	放线菌
	⑧菌落小,圆,灰白,不透明,镜下呈"X"、"Y"或"V"型排列	丙酸杆菌
G^+ 杆菌、有芽孢	⑨菌落圆形,用透射光观察可见斑点,葡萄糖肉汤培养物有絮状或颗粒状沉淀物	梭杆菌属

2. 二级鉴定:

这是在分纯培养到生化鉴定和气、液相色谱分析之间所做的分析鉴定,包括特殊染色和抗生素选择抑制试验等手段。但二级鉴定也包括了部分生化反应试验,如:触酶反应、脲酶试验,吲哚斑点试验、细菌动力实验等等,与三级鉴定之间无严格分界。特殊染色包括:拉丝试验、荚膜染色、芽孢染色、鞭毛染色等。

3. 三级鉴定:

在一、二级鉴定的基础上,增加生化反应,气、液相色谱分析,血清学和分子生物学鉴定。

目前对厌氧菌的鉴定,不能只以生化鉴定结果为最终结论,而应在表型等基本特征的基础上,在细胞组分水平、蛋白质水平以及基因组水平,对厌氧菌的属、种的分类地位给予决定性判断。这些手段包括:细菌代谢产物的气、液相色谱分析,凝胶电泳鉴定,氨基酸序列测定,血清学鉴定,DNA G + C mol% 含量测定,限制性内切酶分析和 DNA 探针鉴定等。

血清学鉴定是在蛋白质水平上一种重要的鉴定方法,而单克隆抗体技术在厌氧菌鉴定等研究上具有常规抗血清无法比拟的特异性、敏感性和可重复性;基于单克隆抗体的免疫荧光法是一种快速、敏感、特异、直观、可定量的鉴定方法。

随着分子生物学的飞速发展,在基因组水平上对厌氧菌进行精确的鉴定和分类已成为

可能。刘鲁川、吉昌华、史俊南等(1995)采用分子生物学和基因工程方法,成功地建立了牙龈卟啉单胞菌(Pg)特异性核酸探针临床鉴定与检测技术。该技术通过 PCR 技术扩增菌毛亚单位蛋白基因(fimA),获得 Pg 菌的特异性 DNA 片段,敏感度高达 0.1ng 级。经过连接、转化、扩增后,分别用核素 ^{32}P 和非核素地高辛对特异性 DNA 片段进行标记,得到 Pg 特异性检测探针。利用该标记探针分别对临床根尖周炎和牙周炎的 200 例标本进行 Pg 检测,结果表明采用这种核酸探针可直接对临床标本进行 Pg 检测。该技术较传统方法显著提高了疾病 Pg 的临床阳性检出率,具有准确、客观、快速、简便的优点,不仅明显优于传统的形态学、生化学、血清和免疫学等检测手段,而且该核酸探针检测技术较全基因组探针、克隆探针等其他分子探针更特异、更快捷。

第二节　感染根管内的常见菌属

感染根管内的细菌种类较多。过去认为导致尖周病的主要细菌是链球菌和葡萄球菌。近年来,随着厌氧培养技术的进展,越来越多的厌氧菌相继被分离,这些厌氧菌与牙髓病、尖周病的发病有密切的关系。

Bergenholtz G(1974)对 84 个因创伤而失活但有完整髓腔的单根牙坏死牙髓进行厌氧培养,发现 64%有细菌生长,而且多数是厌氧菌,其中有产黑色素类厌氧菌、棒状杆菌、梭形杆菌和消化链球菌等;Carlsson J,Frolander F,Sundquist G(1977)对坏死牙髓的细菌学研究中发现,90%分离的细菌是厌氧菌;Zavistoski J,Dzink J,Onderdonk A 等 (1980)对感染根管进行细菌定量研究,发现平均每个死髓牙标本含有 6 种细菌,其中厌氧菌占 2/3,有的一个髓腔可多达 12 种厌氧菌。Fabricius L 和 Dahlen G(1982)用猴牙做实验,发现 X 线片显示有尖周破坏征象的牙中,90%有厌氧菌;并在不同时期的细菌学分析中发现有专性厌氧菌和兼性厌氧菌,专性厌氧菌随着根管感染的时间而增多,兼性厌氧菌则随着感染时间而减少,认为厌氧菌及其产物可以引起尖周病;其中专性厌氧菌是根管内的主要细菌,是引起尖周炎症的有效致病菌。

从 20 世纪 80 年代,我们对牙髓病、尖周病中细菌及其作用进行研究。唐文杰、李春亚、南平等(1986)从 40 例牙髓坏死、尖周炎患牙根管内培养出细菌 50 株,其中厌氧菌 37 株,需氧菌 13 株。张孝齐、杨聚才、田长星等(1986)从 26 例尖周炎和牙周炎患牙根管内培养出单独厌氧菌阳性标本两例,需氧和厌氧菌均阳性标本 24 例。唐安尧(1988)从 45 例感染根管内总共分离出 159 株厌氧菌,通过形态学、革兰染色、生化鉴定,发现它们涉及 9 个属 35 个种。86%的标本是厌氧菌与需氧菌或兼性厌氧菌的混合感染,厌氧菌分离率为 93.3%。重要的厌氧菌分别为普雷沃菌属、卟啉单胞菌属、消化链球菌属、具核梭杆菌属、优杆菌属、韦荣球菌属和放线菌属等(图 8.1~8.61)

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

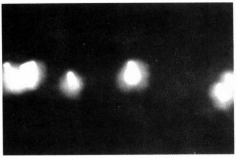


图 8.1　拉氏梭杆菌　×16

中等大小，边缘不齐，不光滑，突起，不规则，白色，不透明，不溶血

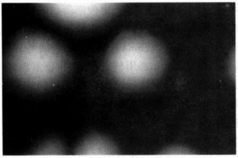


图 8.2　拉氏梭杆菌　×16

大，边缘整齐，表面光滑，扁平，白色，不透明，不溶血



图 8.3　死亡梭杆菌　×16

小，边缘整齐，云雾状，扁平，灰白色，不透明，不溶血

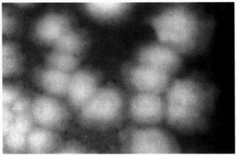


图 8.4　死亡梭杆菌　×16

大，边缘不齐，云雾状，扁平，灰白色，不透明，不溶血

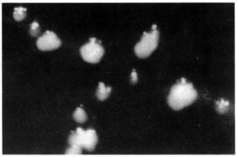


图 8.5　具核梭杆菌　×16

中、小，边缘不齐，突起，不规则，白色，不透明，不溶血

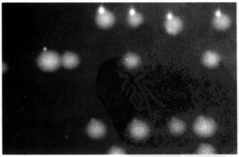


图 8.6　迟缓真杆菌　×16

小，边缘整齐，表面光滑，球形，灰白色，不透明，不溶血

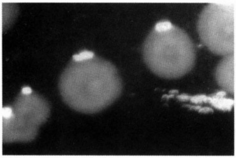


图 8.7　黏液真杆菌　×16

大，边缘整齐，表面光滑，半球形，白色，不透明，不溶血

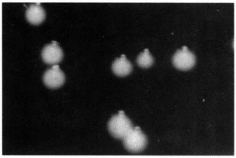


图 8.8　疮疱丙酸杆菌　×16

中等大小，边缘整齐，表面光滑，球形，白色，不透明，不溶血

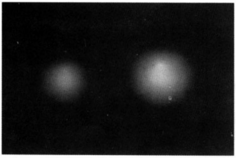


图 8.9　牙双歧杆菌　×16

大，边缘整齐，表面光滑，扁平，灰白色，不透明，不溶血

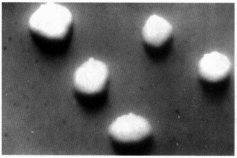


图 8.10　龋病放线菌　×16

边缘整齐，表面光滑，呈"磨牙"状，淡黄色，不透明，不溶血

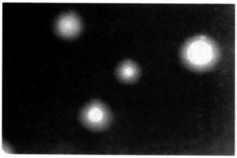


图 8.11　迈氏放线菌　×16

大至小，边缘整齐，表面光滑，半球形，白色，不透明，不溶血

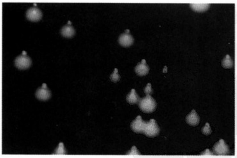


图 8.12　小韦荣球菌　×16

小，边缘整齐，表面光滑，球形，白色，不透明，不溶血

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

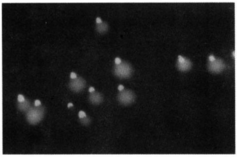


图 8.13　普氏消化链球菌　×16

小,边缘整齐,表面光滑,球形白色,不透明,不溶血

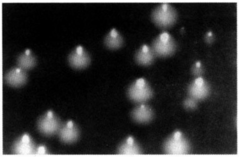


图 8.14　厌氧消化链球菌　×16

小,边缘整齐,表面光滑,球形,白色,不透明,不溶血

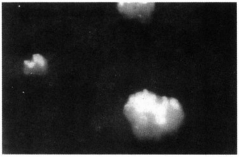


图 8.15　大消化链球菌　×16

大至小,边缘整齐,表面光滑,球形,白色,不透明,不溶血

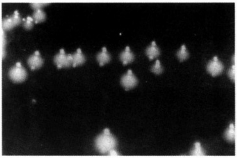


图 8.16　吲哚消化链球菌　×16

小,边缘整齐,表面光滑,球形,白色,不透明,不溶血

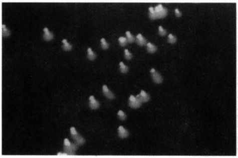


图 8.17　微小消化链球菌　×16

小,边缘整齐,表面光滑,球形,白色,不透明,不溶血

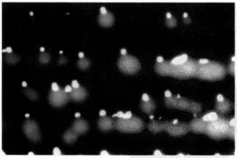


图 8.18　延展消化链球菌　×16

小,边缘整齐,表面光滑,球形,白色,不透明

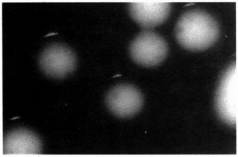


图 8.19　颊普雷沃菌　×16
大，边缘整齐，表面光滑，半球形，白色，不透明，不溶血

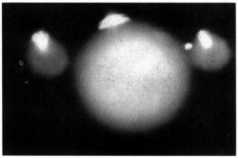


图 8.20　口普雷沃菌　×16
大至小，边缘整齐，表面光滑，半球形，白或淡黄色，不透明，不溶血

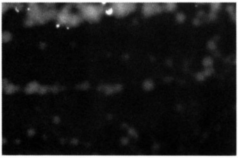


图 8.21　锐利类杆菌　×16
小，边缘整齐，表面光滑，球形，雾状，灰白色，不透明，不溶血

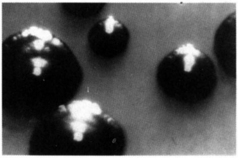


图 8.22　产黑色素普雷沃菌　×16
大至小，边缘整齐，半球形或球形，黑色，不透明，不溶血

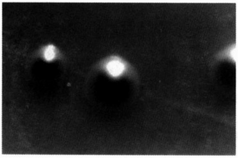


图 8.23　产黑色素普雷沃菌　×16
大，边缘整齐，表面光滑，半球形，中心黑色，边缘棕色，不透明，不溶血

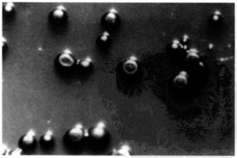


图 8.24　产黑色素普雷沃菌　×16
中等大小，边缘整齐，表面光滑，球形或平顶突起，黑色，不透明，不溶血

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

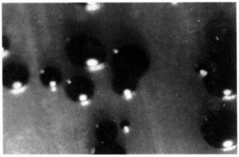


图 8.25　躯体普雷沃菌　×16

中至小，边缘整齐，表面光滑，球形，黑色，不透明，不溶血



图 8.26　赖氏类杆菌　×16

大，边缘整齐，表面光滑，半球形，中心棕色，边白色，不透明，不溶血

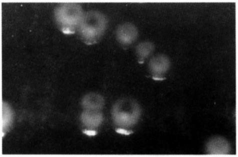


图 8.27　中间普雷沃菌　×16

边缘整齐，表面光滑，扁平，中心棕色，边白色，不透明，不溶血

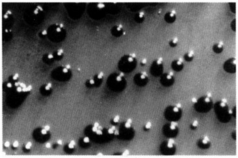


图 8.28　不解糖卟啉单孢菌　×16

中至小，边缘整齐，表面光滑，球形，黑色，不透明，不溶血

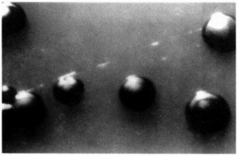


图 8.29　牙龈卟啉单胞菌　×16

大，边缘整齐，表面光滑，半球形，黑色，不透明，不溶血

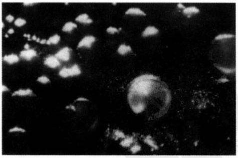


图 8.30　栖牙普雷沃菌　×16

大，边缘整齐，表面光滑，扁平，棕黄色，不透明，不溶血

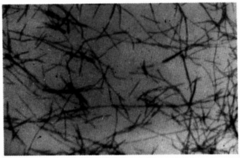


图 8.31　拉氏梭杆菌　×16

G⁻,长短不一,粗细不一,排列紊乱,呈稻草样,中间宽两端尖

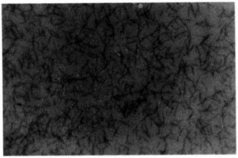


图 8.32　具核梭杆菌　×16

G⁻,大小、长短均匀,排列紊乱,呈典型梭杆状

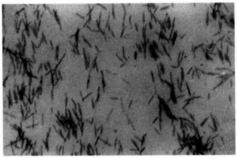


图 8.33　死亡梭杆菌　×16

G⁻,菌体均匀,呈典型梭杆状,排列紊乱

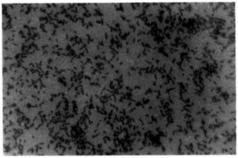


图 8.34　口普雷沃菌　×16

G⁻,球杆状,长短不一,两端圆钝,很少成链

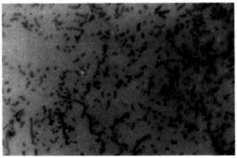


图 8.35　产黑色素普雷沃菌　×16

G⁻,菌体长短不一,短者近似球形,较少呈链,两端圆钝

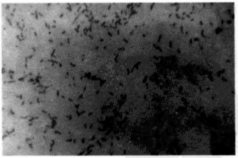


图 8.36　躯体普雷沃菌

G⁻,菌体较均匀,排列不整齐,两端圆钝

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

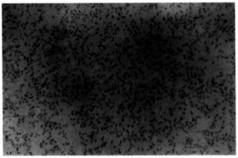


图 8.37　中间普雷沃菌　×16

G⁻,菌体较均匀,两端圆钝,着色浅

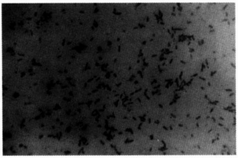


图 8.38　牙龈卟啉单孢菌　×16

G⁻,菌体着色较浅,两端圆钝,不成熟

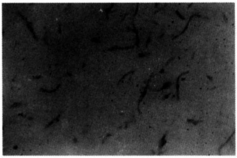


图 8.39　赖氏类杆菌　×16

G⁻,菌体多变,长短不一,部分膨大呈灯球状,着色浅

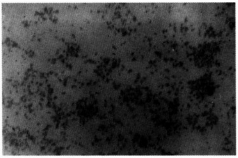


图 8.40　小韦荣球菌　×16

G⁻,球形,成单、双或成堆聚积,着色浅

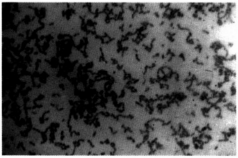


图 8.41　普氏消化链球菌　×16

G⁻,圆或椭圆形,多数成链,部分成单、双,着色浅

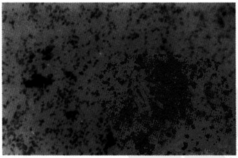


图 8.42　微小消化链球菌　×16

G⁻菌体极小,多数成堆聚体,部分成单、成双

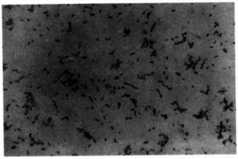


图 8.43　不解糖消化链球菌　×16

G⁻，圆或椭圆形，多数成链，部分成单、成双

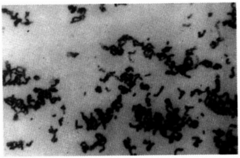


图 8.44　大消化链球菌　×16

G⁻，圆或椭圆形，多数成链，少数成单、双，着色深浅不一

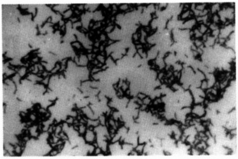


图 8.45　牙双歧杆菌　×16

G⁻，形态多样，以分叉为主，着色深浅不一，常见易染颗粒

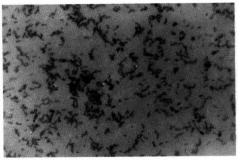


图 8.46　龋病放线菌　×16

G⁻，棒状，多样化，部分可见明显易染颗粒，丝状较少

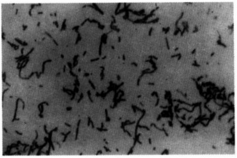


图 8.47　黏液真杆菌　×16

G⁻菌体变样，长短不一，短者近似球形，着色深浅不一

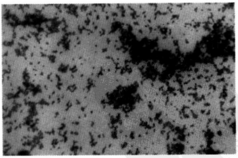


图 8.48　迟缓真杆菌　×16

G⁻，易成堆聚集，少数呈单链状，易与球菌混淆，染色较浅

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取



图 8.49　小韦荣球菌　×15000
球形，成单、双，链状，可见分裂像和衰老细胞

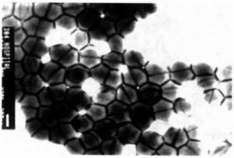


图 8.50　微小消化链球菌　×1200
球形或椭圆形，易聚集成堆，可见明显的对称分裂像

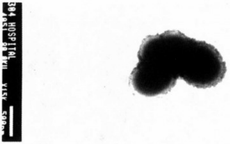


图 8.51　微小消化链球菌　×15000
球形，表面粗糙，可见黏液层



图 8.52　颊普雷沃菌　×12000
杆状或球杆状，表面粗糙不平，呈脑纹状



图 8.53　迟缓真杆菌　×20000
有明显的菌间隔和荚膜样黏液层

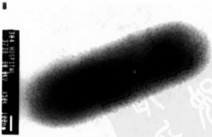


图 8.54　颊普雷沃菌　×50000
可见表面明显的脑纹状结构



图 8.55　口普雷沃菌　×15000
菌体两端圆钝，可见清晰的菌毛

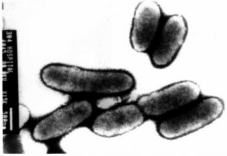


图 8.56　躯体普雷沃菌　×15000
菌体两端圆钝，可见清晰的菌毛



图 8.57　龋病放线菌　×7500
丝状体，形态多变，可见分叉和球形突起



图 8.58　牙双歧杆菌　×10000
典型的双歧样，两端分叉



图 8.59　痤疮丙酸杆菌　×35000
形态多样化，可见明显的三层胞壁

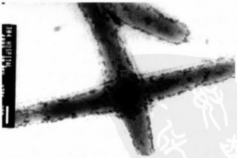


图 8.60　具核梭杆菌　×30000
胞壁上可见规律而不连续的筛孔状结构

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取



图 8.61　具核梭杆菌　×15000
除上述结构外，可见明显的核质易染颗粒

一、感染根管内的常见菌属

(一)产黑色素厌氧杆菌群

G^-产黑色素厌氧杆菌群是一大类在血琼脂平板上能产生黑色或棕色色素的G^-厌氧杆菌的统称，包括卟啉单胞菌属和产黑色素的普雷沃菌属。该类细菌生长时要求有氧化血红素和维生素 K 存在。与牙髓、尖周组织感染关系密切的细菌，主要有产黑色素普雷沃菌(*P. meningenica*)、中间普雷沃菌(*P. intermedius*)、不解糖卟啉单胞菌(*P. asaccharolytica*)、牙髓卟啉单胞菌(*P. endodontalis*)和牙龈卟啉单胞菌(*P. gingivalis*, *Pg*)等。

产黑色素的G^-厌氧杆菌群是感染根管中的优势菌，但不同的研究其检出率不同，这可能与个体和方法学差异有关。有实验从 72 例根尖周炎患牙的 22 个根管中培养出产黑色素的G^-厌氧杆菌，还有学者在 50%的非龋性的坏死根管中分离出该类菌。临床样本中最常检出的是中间普雷沃菌、牙髓卟啉单胞菌和牙龈卟啉单胞菌。

牙髓卟啉单胞菌被认为是牙髓感染的特殊病原菌，从 11%牙体完整的感染根管中培养出该菌，但也有文献报告，该菌在感染根管中的检出率不及牙龈卟啉单胞菌。牙髓卟啉单胞菌多从根管和根尖脓肿中分离，不易在口腔一般部位检出，其原因可能在于它缺乏菌毛，难以附着于口腔软组织上。与此相反，具有菌毛的牙龈卟啉单胞菌可牢固地附着于宿主组织细胞和牙菌斑中的G^-细菌上。与牙龈卟啉单胞菌相似，牙髓卟啉单胞菌也具有很强的诱导化脓性感染的作用。薛毅、许丽华、史俊南等(1994)从尖周脓肿脓液标本中分离出了牙髓卟啉单胞菌并进行了培养、鉴定，分析了其血清学特征。张郁、蔺俊、史俊南等(1990、1991)发现：10μg/mL 的牙髓卟啉单胞菌 ATCC35406 的脂多糖(LPS)能引起明显的破骨细胞性骨吸收，他们对该菌种的脂多糖进行了提纯和鉴定，并进一步发现该脂多糖对体外培养的人牙髓和牙周膜成纤维细胞的生长具有明显的抑制作用。

中间普雷沃菌在晚期牙髓炎、尖周炎和成人牙周炎的感染过程中具有重要意义，许丽华、薛毅、史俊南等(1991)通过免疫动物、细胞融合等得到 3 株抗中间普雷沃菌的单克隆抗体，并用于中间普雷沃菌致病性及其机制的研究，结果提示中间普雷沃菌可能存在不同的血清群。倪龙兴、史俊南、杨聚才等(1990、1993)发现：中间普雷沃菌在感染根管内和牙周病灶中检出率均高，原因可能是它具有较广的协菌谱。

牙龈卟啉单胞菌也是感染根管内的常见菌，许丽华、薛毅、史俊南等(1991～1995)通过将牙龈卟啉单胞菌纯培养物接种兔耳和背部皮下，证实它们是能引起组织损害的可疑病原

菌。在小鼠动物模型上，探讨了体液免疫反应在牙龈卟啉单胞菌感染中的作用，结果提示：用牙龈卟啉单胞菌免疫后的动物，对细菌的再次侵入具有明显的耐受力。他们还发现了牙龈卟啉单胞菌感染与牙周病之间的密切关系。许丽华、谭巨莲等(1992、1994)从慢性成人牙周炎龈下菌斑中分离出了牙龈卟啉单胞菌并进行了培养、鉴定。赵守亮、刘智广、孙叶芳等(1994,1995)用盐析和高效液相色谱的方法，提取并纯化了牙龈卟啉单胞菌荚膜，证实其主要成分为糖蛋白，且对成纤维细胞 L929 具有毒性作用。研究表明荚膜是一热不稳定性物质，80℃水浴 20 min 活性完全丧失；对荚膜进行了 SDS - PAGE 分析和氨基酸组成分析，研究发现，荚膜对人牙龈、牙周膜成纤维细胞的生长具有抑制作用；抑制人牙周膜成纤维细胞在根面上的附着，可使细胞的线粒体减少、粗面内质网肿胀。倪龙兴、史俊南、陈镔复等(1994,1995)用盐析、超滤、超速离心等方法提取了牙龈卟啉单胞菌等的胞外膜泡、外膜蛋白复合物，对胞外膜泡进行了电镜观察、SDS - PAGE 分析和氨基酸组成分析；并进一步对胞外膜泡中的胰酶样蛋白酶(TLP)进行了检测和分离、纯化，测定了其理化性质；还对膜泡中的牙龈毒素进行了纯化和毒理学研究。

内毒素是产黑色素厌氧杆菌群共同的毒力因子，荫俊、张郁、史俊南等(1991,1992)对内毒素化学组分和病理作用进行了深入的研究，发现内毒素主要由糖类、脂肪酸类和磷组成；内毒素对集落刺激因子、白细胞介素 - 1、肿瘤坏死因子、血清干扰素具有诱导或诱生作用；对人牙髓、牙周膜成纤维细胞具有细胞毒作用，能对细胞的 DNA 含量、超微结构等产生影响。在临床研究方面，检测了 19 例慢性尖周肉芽组织标本中的内毒素含量，发现内毒素阳性率在有症状组为 100%，无症状组为 75%，有症状组内毒素含量明显高于无症状组。

这些研究表明：产黑色素厌氧杆菌群在牙髓病、尖周病病因学方面占据着重要地位，内毒素是其最主要的毒力因子。

(二)不产黑色素的普雷沃菌

目前，对该类细菌在口腔中的分布和其与口腔疾病的关系还未进行深入研究，但它在根管中的检出率几乎与产黑色素的厌氧杆菌一样高。其中，最多见的是颊普雷沃菌、口普雷沃菌和口腔普雷沃菌。Haapasalo M 等(1986)对 62 个感染根管中的厌氧杆菌的分离研究发现，31 个根管分离出产黑色素的厌氧杆菌，32 个根管中分离出不产黑色素的厌氧杆菌。Johnstone 等(1987)从 56%的牙髓坏死根管中分离出不产黑色素的厌氧杆菌，其中颊普雷沃菌和口普雷沃菌占 77%。

颊普雷沃菌具有高度免疫原性的结晶蛋白质表层，谷信等(1987)报道其培养上清液中可溶性成分和内毒素有较强的促有丝分裂样活性，刺激小鼠产生白细胞介素 - 1(IL - 1)的作用较沙门菌还强。说明颊普雷沃菌尽管内毒素活性低，但诱发变态反应的作用较强。这种反应可能成为慢性尖周炎的主要原因，也可能是有该菌繁殖的感染根管常有主观症状的原因。

(三)梭杆菌属

梭杆菌属为 G^- 专性厌氧菌。其中具核梭杆菌是感染根管及根尖脓肿的优势菌，其培养物因产生硫化氢和甲硅醇等挥发性硫化物而具有特殊的恶臭味。Haapasalo M 等(1986)从 12%的感染根管中检出了具核梭杆菌。Sundquist 等(1989)在 22 例感染根管中从 16 例中检出了该菌，是检出率最高的菌种。Heimdahl A, Von Konow L, Satoh T 等(1985)对牙源性感染所致的颌面部感染的细菌学研究发现，重度感染病例的具核梭杆菌检出率明显高于轻度

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

感染者，提示具核梭杆菌与牙髓炎症的发生、发展有着密切关系。

具核梭杆菌不仅在牙髓、尖周感染中检出率高，同时其毒力也较强，其内毒素诱导 IL－1 的能力和致炎作用比牙龈卟啉单胞菌和黏性放线菌强。另外，具核梭杆菌能与牙髓卟啉单胞菌发生明显的共聚作用，能降低甲硝唑的抗菌作用，从而使牙髓卟啉单胞菌得以生长、繁殖。

荫俊、张郁、史俊南等(1991，1992)对具核梭杆菌的致病机制进行了深入探讨，发现与产黑色素厌氧杆菌相似，内毒素是起决定性作用的物质。他们提纯、鉴定了具核梭杆菌的脂多糖，发现具核梭杆菌的内毒素对集落刺激因子、IL－1、肿瘤坏死因子、血清干扰素也具有诱导或诱生作用；同时对人牙周膜成纤维细胞具有细胞毒作用，对牙髓、牙周膜成纤维细胞的 DNA 含量、超微结构等也产生影响。

(四)消化链球菌属

除上述细菌外，消化链球菌属也是牙髓病、尖周病中分离率较高的细菌，特别是在有症状的病例。Yoshida M，Fukushima H，Yamamoto K 等(1987)，山本(1988)，Lewis(1986)等的研究都表明感染根管中该菌属的检出率较高，国内学者的研究也得出了同样的结果。梁景平等(1991)对感染根管厌氧菌的研究发现，在三分之一的感染根管中分离出了消化链球菌属，且在厌氧菌中占的比例较高，在慢性根尖周炎组，消化链球菌属占可培养厌氧菌总数的百分比高达 41%，急性发作时为 59%。邓惠姝等(1993)的研究表明：从 17% 的感染根管中分离出了该菌属。

(五)放线菌属

放线菌属是 G^- 厌氧或兼性厌氧菌。在牙髓和根尖周感染中常可检出的放线菌，包括衣氏放线菌、内氏放线菌、溶牙放线菌和黏性放线菌。放线菌不产生内毒素，缺乏组织分解酶，一般认为它导致组织慢性炎症。研究发现，放线菌与窦道长期不愈、尖周骨质破坏有密切关系。

(六)能动细菌

厌氧性 G^- 能动菌也常从感染根管中检出，有研究表明，在所培养出的根管细菌中该菌的比例可达 9%。Tanner AC，Visconti RA，Holdeman LV 等(1982)发现根管和牙周袋中分离出的沃廉菌的 DNA G＋C mol%有高度同源性。此外，所有分离出沃廉菌的感染根管均伴有根尖骨质的破坏，而分离出沃廉菌的牙周病患者多有明显的牙槽骨吸收和临床炎症。

二、应该注意的一些问题

20 世纪 80 年代，口腔厌氧菌学研究领域中有一个常用的词，叫“产黑色素类杆菌群(black－pigmented bacteroides group，BPB)”，它是对所有能在血平板上产生黑色或褐色菌落的原类杆菌的总称，但目前，BPB 这个词在国外专业杂志上已停止使用了，究其原因显而易见：BPB 实际上已涉及了不同的属和种。另外，国际系统细菌学会 G^- 菌分类学分会在 1988 年就已重申：类杆菌中黑色素的产生特征，并非是分类学依据，因为此特征的显现与否主要与培养条件有关。但查阅我国的专业杂志，直到近年，一些刊登的论著中仍有“产黑色素类杆菌群”或“BPB”之类的称谓，这可能是不妥当的。如果一定要使用这样的称谓，也可以叫做“产黑色素口腔厌氧菌群(black pigmented oral anaerobes，BPOA)”，而这一菌群实际上已涉及了多个不同的菌属。

同样，原类杆菌属中的“牙龈类杆菌”，在 Shah 等(1988)提出划归卟啉菌属后的 3~4 年内，国外论著作者常把牙龈卟啉菌和“牙龈类杆菌”两种称谓用伴随提出的方式出现在文章的题目、摘要和正文的开头语中，而且如今“牙龈类杆菌”一词已完全停止使用。因此，论著作者在叙述时，应十分重视细菌分类学的新进展、新定位，这不仅可避免读者在阅读时可能引起的误解或混淆，也从侧面反映了作者阅读相关文献的全面性。

对于新提出的细菌分类命名，当然有接受或不接受的可能，作者如持异议，可以不改原称谓，但对于新的称谓，应在文章中提到，这样才能给读者尽可能多的参考价值和信息。另外，陶天申等著文指出：International Journal of Systematical Bacteriology(国际系统细菌学杂志)是具有细菌命名优先权的合格发表杂志，所以，如果注意该杂志的相关文献，也可以了解国际上的细菌学分类进展。

由于汉语和英语(西语)来自于完全不同的语言起源，所以即使对某个特定菌种，由于译者所注重的角度和方言等因素的不同，常可产生音似或意似但形异的译名，这实际上不利于国内同行的相互交流。科技的不断进步、研究的不断深入以及与国外交流的日益增多，常给新分类的细菌的命名带来困难，作者认为：对于新分类或新命名的细菌，暂时可直接引用原文，或以原文名为主，附以暂译名，这也有利于在将来的数据网络中查询和共享。另外，按规定，在杂志刊登时，细菌的属种名称应用斜体印刷，这也应该引起注意。

三、常见菌属与临床症状之间的关系

在正常情况下，牙髓组织由釉质、牙本质和牙骨质所组成的坚硬腔体所保护，周围的硬组织可作为对牙髓有害刺激的屏障，且对温度刺激也有绝缘作用。但微生物通过下列 3 种主要的途径能对牙髓造成刺激或损伤：

1.通过牙本质小管：由于手术操作切割、外伤和龋病损害等因素，使牙本质暴露于口腔环境中，各种条件致病菌可通过牙本质小管进入牙髓，造成对牙髓的侵害。除上述因素外，还有如磨损、楔形缺损、隐裂、畸形舌侧窝和畸形中央尖以及制洞时的意外露髓等，微生物及其毒素均可以透过牙本质小管进入牙髓，如已露髓，则更可直接进入牙髓。

2.通过侧副根管：牙周病患牙牙周袋的微生物及其毒素可通过根分叉处和根旁侧的侧副根管、根尖孔等处，侵入牙髓，临床上常称这种感染为逆行性感染，因牙髓病变一般从根髓开始，继而上升至冠髓乃至整个牙髓组织。

3.由血液侵入：有学者报告在其他脏器患急性感染时，可产生菌血症或败血症，微生物及其毒素有可能经过血液侵入牙髓，引起牙髓炎症，这种感染称为血源性牙髓炎，由血循环中的细菌，停留于牙周及牙髓组织毛细血管内，引起感染。如果存在局部无菌性炎症，或牙髓组织因为外伤而急性坏死，则血流中细菌由于摄菌作用(anachoresis)过程而很容易停留于此，从而引起牙髓及根尖炎症。有关这种过程有几种解释，如纤维网的机械阻碍、输出淋巴管栓塞、渗透压改变、组织的静电状态、吞噬细胞和细菌的凝集作用等，这些解释均有证据不足之处。近年来的研究表明：健康者血液循环中有微生物存在者占 5%，有鼻窦炎、扁桃体炎以及其他病灶者，其百分率更高。实际上，患有牙周病者其菌血症占 10%。牙体、牙龈手术及其他手术如拔牙等菌血症更高，所以，相当多的人带有短暂的菌血症。如果这些人的牙龈、牙髓和尖周组织受刺激而发生无菌性炎症，则血循环中的细菌可大量停留于局部而发生牙龈、牙髓和尖周炎症。制洞、药物刺激牙髓(如酸蚀等)可引起摄菌作用，故在制

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

洞,或使用刺激性药物时,如不注意,有可能使菌血症中的血循环细菌聚集于此区,而产生手术性"特发性"牙髓、尖周感染。

感染根管内的病原菌与临床症状间的关系一直是国内外学者感兴趣的课题,许多学者对此进行了大量深入的研究。

唐安尧(1985)对45例感染根管分离出的159株厌氧菌与临床症状间的关系进行分析,结果表明:在所有的感染根管中,未发现特异性致病菌,感染根管内主要为混合感染。但在有临床症状的根管中,厌氧菌分离率达90%左右,而无症状者多以兼性厌氧菌为主,细菌检出率只有50%。在伴尖周肿胀的病例中,消化链球菌属和产黑色素厌氧杆菌较其他各属有显著差异;伴有恶臭的病例,产黑色素厌氧杆菌群和梭杆菌属较其他各属有显著差异。内毒素是存在于G^-厌氧菌细胞壁外膜中的脂多糖成分。在细菌生长过程或死亡溶溃后释放,具有多种生物活性,是一种强免疫原物质,在尖周病变中具有重要致病作用。荫俊对感染根管内内毒素活性与临床症状间的关系进行了研究,结果显示:有叩痛、自发痛和伴有骨吸收的感染根管中内毒素含量均高于无疼痛组。

张郁、荫俊、史俊南(1992)通过产色基质鲎试验法对尖周肉芽肿中的内毒素作定量分析,结果显示:19例慢性根尖肉芽组织有症状组(11例)内毒素阳性率100%,无症状组(8例)内毒素阳性率75%,两者间有显著性差异。以上研究表明感染根管中主要是混合感染,但有临床症状的根管中,主要由厌氧菌组成,而且由厌氧菌产生的内毒素不仅存在于根管中,而且存在于尖周病变组织中,其对尖周组织造成的直接损伤和强有力的免疫原性是引起临床症状的主要因素。产黑色素厌氧杆菌群在牙源性颌面部感染中具有重要意义。

薛毅、许丽华、史俊南(1999)对44例牙源性脓肿(其中尖周脓肿24例)患者进行了产黑色素厌氧杆菌群的分离鉴定,38例存在产黑色素厌氧杆菌(其中尖周脓肿21例)。另外,通过对80例尖周病患者临床症状和感染根管产黑色素厌氧杆菌关系的研究显示:慢性尖周炎急性发作病例中产黑色素厌氧杆菌的检出率明显高于慢性尖周炎,而且根管内产黑色素厌氧杆菌检出率与自发痛、叩痛、局部肿胀、根管臭味、尖周稀疏区、根管渗液和窦道形成等有显著关系。许丽华的检测表明:牙髓坏死病例中存在产黑色素厌氧杆菌,慢性尖周炎时产黑色素厌氧杆菌检出率为41.2%,慢性尖周炎急性发作期则上升至79.3%。说明产黑色素厌氧杆菌群不仅存在于尖周病变期,在早期便寄居于感染根管内,在人体抵抗力下降时,可沿根管向尖周区迁移,成为尖周病变的重要病源,参与慢性尖周炎的急性发作过程。

综上所述,感染根管是由口腔正常菌群引起的内源性感染,属于需氧、厌氧菌混合感染。但在有临床症状的感染根管中主要以厌氧菌感染为主。厌氧菌是感染根管的优势菌,在尖周炎的发生、发展中起着重要作用,其中专性厌氧菌占绝对优势。对感染根管的细菌学研究和细菌与临床症状间关系的研究为临床选择敏感药物治疗牙髓病和尖周病提供了理论依据和指导原则。俞立英等对56例感染根管进行细菌培养,并用琼脂稀释法对细菌进行药敏试验,结果显示感染根管的细菌检出率、阳性率均很高,除少数菌种外,大部分厌氧菌、需氧菌对各种抗菌药物均敏感,如对青霉素G、青霉素V、甲硝唑的敏感率达100%,对红霉素的敏感率达90%以上。从细菌学的观点来看,选择具有消灭或抑制G^-厌氧菌的药物,对治疗感染根管和化脓性根尖周炎是一个有效措施。但青霉素、红霉素等抗生素多用于全身用药,局部根管内使用的效果和过敏问题尚需要进一步研究。今后,根据感染根管细菌感染特点研制有效的局部治疗药物,对提高牙髓病、尖周病疗效将很有帮助。

四、一些重要的细菌致病因子

微生物尤其是细菌感染是牙髓病发生发展的主要因素。能够引发牙髓组织感染的细菌毒力因子相当广泛和复杂，目前研究较多的包括胞壁成分、可溶性因子、酶以及毒素等。

（一）G^-细菌的内毒素脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）

LPS 由 O－特异性多糖链、核心寡糖和类脂 A 构成。LPS 的生物学活性相当广泛，它所引起的细胞信号级链反应多样而复杂，有关 LPS 的研究已经持续了数十年，但目前仍在深入进行。目前所知，LPS 的信号转导首先通过其受体（如 CD14，巨噬细胞清道夫受体，β 整合素等）结合，将信号转导至细胞内。LPS 结合蛋白（LBP）参与 LPS 与受体的结合及其在细胞膜的分子锚定，BPI（杀菌性－渗透性增加蛋白）则调节着 LPS 信号的细胞内转导。在细胞内，LPS 不仅调节着多个细胞因子（ILs，TNFs 等）的生物学活性，也通过激活细胞内重要的转录因子（NF－κB，Cbf－α 等）参与广泛的细胞活动。

王胜朝（2000）采用 PCR 方法重组 CD14 基因，将突变体导入 COS－7 细胞进行重组基因的瞬时表达，并导入 CHO－dhfr 细胞，获得稳定表达重组基因的克隆细胞，经过免疫组化研究表明：健康牙髓组织 CD14 表达细胞很少，牙龈皮下结缔组织 CD14 染色也为阴性。

LPS 在低浓度下可抑制牙髓细胞的增殖，通过使细胞周期调控基因 PCNA、Cyclin D1 表达下调，而 P27KIP1、P21CIP1/WAF1 表达上调的机制阻止牙髓细胞于 G1 期，影响牙髓细胞的增殖周期，引发细胞凋亡。在 LPS 低浓度下，牙髓细胞的内源性 TGF－β 表达明显增加，说明 TGF－β 参与了早期 LPS 对牙髓细胞损伤的修复。外源性 TGF－β 通过增加 S 期细胞、减少 G1 期细胞影响细胞周期，促进牙髓细胞增殖。凋亡调控基因 bcl－2－bax 和 fas－fas L 参与了牙髓细胞凋亡调控，将 bcl－2 导入牙髓细胞，可降低 LPS 对牙髓细胞的细胞毒性作用，减少牙髓细胞凋亡。

类脂 A 是内毒素结构中最保守的部分，也是内毒素的“毒力中心（endotoxic principle）”，所以类脂 A 是中和内毒素活性的理想靶标。用小分子中和内毒素活性是一个活跃的研究方向，高亲和力是中和分子的前提和关键，小分子分为肽类和非肽类，而肽类又是其主要研究方向。姜明（2003）应用噬菌体展示肽库（十二肽库）技术筛选 LPS 类脂 A 部分的结合肽，测序结果显示，获得一条肽 A1，它具有转运肽的作用。

（二）细菌胞外膜泡（extracellular vesicles，EV）

EV 是细菌外膜向外膨出呈芽状，在形成独立成分后，游离进入周围微环境的一种泡状膜结构。它是许多 G^-菌的一种适应性或功能性生物学特征。EV 作为毒力成分的载体，有完整的膜结构，在毒理学和免疫学特征上与细菌本身相似，所以在某种程度上具有细胞样特性，然而它体积小（30～300nm），可透过微小间隙、解剖屏障，故又具有大分子样作用，它在形成过程中包容并浓缩了许多细菌固有的成分，游离出来以后，扩展了细菌毒力作用的范围和强度。Shah 等（1992）在临床标本中证实：Pg 的 EV 能到达深层组织造成“远程破坏（distance destruction）”作用。在牙周病中，尤其与牙周膜附着丧失、结合上皮回复到原附着点的可逆性小、牙周袋的非手术治愈率低等有非常密切的关系。

有关 EV 的形成机制有这样一种假设：细菌 EV 形成是由于其外膜生长速度超过下层——糖肽层的生长速度所致。当外膜物质形成过多后，可发生向外呈泡状隆起，如果继续下去泡状隆起最终可形成完整的 EV 而被游离出来。它的结构与细菌结构相似，从最外层

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

向内分别为荚膜(capsule)、外膜(outer membrane)、浆周层(periplasmic space)以及最内层的胞浆膜(cytoplasmic membrane),电镜下可见由外向内呈链样穿行的颗粒状糖肽(peptidoglycan)结构。EV 的生物学活性较为广泛(表 8.3)。

表 8.3 与 EV 有关的生物学活性

生物学活性	涉及的菌属
结合于:羟基磷灰石表面	噬纤维菌属,卟啉单胞菌属,普雷沃菌属
细菌	卟啉单胞菌属,普雷沃菌属
血细胞	卟啉单胞菌属,噬细胞菌属
抗体	放线杆菌属
细菌素	类杆菌属
蛋白酶	卟啉单胞菌属,普雷沃菌属,假单胞菌属
其他活性酶	嗜二氧化碳噬纤维菌属,卟啉单胞菌属,普雷沃菌属
纤维素	类杆菌属,纤杆菌属
毒性:肠毒素	大肠杆菌属,放线杆菌属
LPS	奈瑟菌属,大肠杆菌属,卟啉单胞菌属,普雷沃菌属
骨吸收因子	放线杆菌属
白细胞毒性因子	嗜碳酸噬细胞菌属,放线杆菌属

(三)荚膜

荚膜是多数厌氧菌所具有的表层结构,它是由厌氧菌在生活状态下不断地分泌产生的黏液状物,经排出体外后包绕于菌体表面而形成。厌氧菌荚膜的检测方法与需氧菌相似,包括光学显微镜法和电子显微镜法。光学显微镜检测的标本可用 Hiss 法染色,也可用印度墨汁染色。电子显微镜检测的标本可用钌红或高碘酸朱叉二肼蛋白银或铁蛋白标记的兔抗血清染色。

荚膜的形成受包括宿主本身生理条件在内的多种因素影响,在体内能形成丰富荚膜的细菌,在含血清或血液等营养丰富的培养基上形成的荚膜则不甚明显,在人工培养基上连续多次培养则除个别菌种外,多数细菌荚膜就会消失。反之,通过接种动物一段时间后再分离细菌,失去的荚膜又可恢复。荚膜的合成速率在不同的生长时期存在着差异,Main 等(1978)报告假单胞铜绿杆菌荚膜的最大合成速率在其对数生长期,研究证实荚膜的合成、分泌和表面表达受细菌基因调控,并且这些基因处于同一基因簇中,通过质粒转染可使无荚膜菌株携带丰厚的荚膜。

荚膜的主要成分是水,最主要的有机成分包括蛋白质、多糖和多肽等。在早期的研究中,由于荚膜提取方法的限制,仅保留了荚膜的多糖成分,因而认为厌氧菌荚膜是由多糖构成的。Willson M, Kamin S, Harrey W(1995)以盐析法提取放线共生放线菌荚膜,并证实是由糖蛋白构成,蛋白质与糖的比例为 2.2:1,之后的研究证实了牙龈卟啉单胞菌(Pg)、牙髓卟啉单胞菌(Pe)、中间普雷沃菌(Pi)的荚膜等也均为糖蛋白,蛋白质与糖的比例分别为8.9:1、6.5:1 和 9.0:1。十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)显示:Pg、Pi 和 Pe 荚膜蛋白成分比较复杂,其分子量约为$(5.0 \sim 5.5) \times 10^4$ Da,氨基酸分析显示:上述 3 种荚膜中氨基酸组成基本相似,其中甘氨酸、谷氨酸和丙氨酸所占百分比较高,为 3 种主要氨基酸成分。在个别氨基酸浓度上也存在着差异,Pg 中亮氨酸、Pe 中天冬氨酸和 Pi 中脯氨酸含量较高,说明 3 种荚膜在结构上存在着一些差异。

免疫化学证实厌氧菌荚膜具有抗原性,研究显示:不解糖类杆菌的荚膜抗原有种或亚

种的特异性，不同种或亚种之间没有交叉，不同菌株的脆弱类杆菌其荚膜抗原不同，交叉反应仅出现在比同一菌株抗原浓度高 10 000 倍的时候。

厌氧菌荚膜属热不稳定性物质，研究表明：Pg 荚膜在 50℃下水浴 30min，活性基本无改变；65℃水浴 30min，近 50%的活性丧失；80℃水浴 30min，Pg 荚膜活性完全丧失。

荚膜作为厌氧菌表层结构，在细菌生活状态下不断被分泌、产生，并极易溶于组织液。一方面可以保护菌体免遭吞噬细胞的吞噬和消化，并抑制机体溶菌酶、碱性多肽等非特异性保护机能；另一方面，厌氧菌荚膜可引起宿主组织破坏，并且部分溶解入组织液的荚膜可达到细菌所不能侵及的远层区域。

Wilson M, Kamin S, Harrey W(1985)对放线共生放线菌荚膜进行了研究，证明荚膜对人牙龈成纤维细胞的 DNA 合成、胶原合成和矿化均有明显抑制作用，并且这种抑制作用不是由于细胞死亡所致，经荚膜作用 72h 后的细胞，其细胞核面积增加近 1 倍。赵守亮、史俊南、肖明振(1995)，张亚庆、肖明振、赵守亮(2001)等的研究证实，Pg、Pi 荚膜具有与放线共生放线菌荚膜类似的作用，经 Pg、Pi 荚膜作用后的成纤维细胞和细胞核面积增大、DNA 合成抑制、细胞数明显减少。采用台盼蓝染色后色度测量等方法，观察人牙周膜成纤维细胞在根面上再附着的能力。结果表明，荚膜可以明显抑制人牙周膜成纤维细胞在根面上的附着，抑制机制可能包括：荚膜对牙周膜成纤维细胞直接的生长抑制、和由于附着于根面上的荚膜使根面牙骨质表面性质改变而导致细胞附着减少两个方面。Helgeland K, Nordbg B (1993)根据放线共生放线菌培养液提取物(主要成分为荚膜)作用后成纤维细胞的表现：细胞、细胞核增大，核仁增多；细胞增长不可逆性抑制，细胞蓄积于分裂周期的 G_2 期；细胞保持相当长时间的活力等，认为荚膜可导致成纤维细胞的"过早老化"。

厌氧菌荚膜对骨代谢也有着较强的影响，研究表明放线共生放线菌荚膜具有极强的骨吸收活性，纯化荚膜在 10ng/mL 时即可引起鼠头盖骨的明显脱矿，其活性强度较同源菌的内毒素脂多糖高 1 000 倍，并且对成骨细胞的 DNA 合成和骨胶原合成也具有明显的抑制作用，说明荚膜既是有效的骨吸收介质，又是有效的骨形成抑制剂。

破骨细胞是由骨髓中的粒－巨噬细胞系分化而来，是骨组织破坏的主要细胞成分。研究显示：当粒－巨噬细胞集落刺激因子存在时，人骨髓粒－巨噬细胞与厌氧菌荚膜共同培养 3 周，牙龈卟啉单胞菌荚膜组、中间普雷沃菌荚膜组抗酒石酸盐酸性磷酸酶阳性多核细胞明显增多，可见典型的单个核细胞融合为多核细胞的过程。扫描电镜下可见典型的破骨细胞形态，单个核细胞及在牙本质片上形成大量大小不等、深浅不一的吸收陷窝，说明荚膜有着明显的促进破骨细胞形成和破骨功能活化的作用，并且对单个核的破骨细胞前体细胞也具有类似的作用。

Ueda N, Nishihara T, Ishihara I 等(1995)的研究证实：放线共生放线菌荚膜多糖可促进鼠骨髓破骨细胞形成，而其内毒素脂多糖中的多糖成分则无促进作用。荚膜多糖诱导破骨细胞形成过程中有前列腺素 E_2 的参与，采用前列腺素阻断剂消炎痛可抑制破骨细胞的形成。

Meghji S, Wilson M, Henderson B 等(1992)对荚膜的骨吸收机制研究显示：消炎痛可阻断放线共生放线菌、牙龈卟啉单胞菌荚膜对鼠头盖骨 DNA 合成和骨胶原合成的抑制作用，消炎痛部分阻断腐生埃肯菌荚膜的作用，说明前列腺素类物质参与了荚膜对鼠头盖骨 DNA 合成和骨胶原合成的抑制，而腐生埃肯菌荚膜的抑制作用除前列腺素类物质参与外，尚有

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

其他介质参与。

厌氧菌荚膜除上述作用外，对单层上皮细胞也有轻微的毒性，并可抑制上皮的增生，对中性粒细胞有较强的杀伤作用，由于中性粒细胞通过调理吞噬来消除活的和死的细胞，这种活性的破坏可使炎症明显加剧。Harvey W，Kamin S，Meghji S 等(1987)的研究显示，嗜血性放线共生放线菌荚膜具有白细胞介素－1 样活性，在细胞介导的免疫和牙周结缔组织破坏中具有重要的作用。Tolo K，Helgeland K(1991)在放线共生放线菌荚膜中观察到能与 IgG 的 Fc 段结合的成分，认为这种能与 Fc 段结合的成分可能与牙周病损有关。荚膜是类杆菌属的重要毒力因子，有较强的脓肿形成能力。研究显示：有荚膜的类杆菌，单独接种便可引起脓肿；脆弱类杆菌的荚膜多糖单独给动物接种，无需与菌体一起即可产生典型脓肿，而无荚膜的类杆菌则不能。在混合感染中，有荚膜的类杆菌也起着重要作用，有荚膜的脆弱类杆菌能促进需氧菌和兼性需氧菌的生长繁殖，而无荚膜的类杆菌在混合感染中的重要性几乎总不如需氧菌。这些对以混合感染为主的牙髓病、尖周病无疑是很有意义的。

不同菌种厌氧菌不仅荚膜含量不同，而且荚膜毒力也存在着明显差异，研究显示：牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌、牙髓卟啉单胞菌荚膜在抑制成纤维细胞分裂、增殖，成骨细胞的 DNA 合成和胶原合成，以及诱导破骨细胞形成，促进骨吸收等诸多方面均有显著性差异，其中以牙龈卟啉单胞菌荚膜最强，中间普雷沃菌荚膜其次，牙髓卟啉单胞菌荚膜最弱。

荚膜是目前已知的口腔厌氧菌中毒力最强的一种致病物质，与内毒素脂多糖的相对不溶性，通常只有细菌溶解后才释放脂多糖和常常形成大分子量聚合体等特点相比较，在厌氧菌致病方面具有更重要的意义。

第三节　感染根管内微生物之间的相互作用

感染根管内大多是以厌氧菌为主的混合感染，而这些感染会随着环境条件的变化而扩散加重或减弱消失。在影响感染的众多因素中，细菌之间的相互作用有着不可忽视的地位。人们从细菌协同现象的发生、机制的探讨和各种模型的制作等各个方面进行了深入的研究。Baumgarter 等(1989)用小鼠模型的方法评价感染根管内厌氧菌的致病性和相互作用，他们把小鼠分组后分别进行单菌接种，具核梭杆菌与其他厌氧菌两两混合接种，出现的症状按轻重分级计分，结果在 18 个混合组中，有一半的总分比单菌接种组高。倪龙兴、史俊南、孙叶芳等(1990)用产黑色素厌氧杆菌和具核酸杆菌分别作单菌和混合菌接种小鼠皮下，发现混合接种的细菌毒力明显高于单菌接种，不仅注射部位全部出现脓肿，还形成了转移性腹腔脓肿、肝脓肿和眶内脓肿。另外，倪龙兴等还观察了牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌和产黑色素普雷沃菌与兼性厌氧菌(α－溶血性链球菌)之间在毒力和致病性上的相互影响，结果显示，混合接种组细菌毒力明显增强，注射区以外转移性脓肿的形成率增加，小鼠死亡率增加，原接种菌的存活率提高。表明感染根管内优势厌氧菌与兼性厌氧菌之间存在着明显的协同作用。

在细菌的致病过程中，细菌之间的相互作用包括协同、共栖和拮抗。两种或两种以上的细菌出现在感染部位时是混合感染，而不一定是协同感染，所谓协同作用是指两株或两株以上的细菌混合后，它们之间的相互作用能够产生任何单株细菌都不能产生的效果。研究结果表明：混合感染中的细菌常有协同作用，它们造成的组织破坏重，容易影响周围组

织,并且常不可逆;单菌感染的组织破坏轻,有时可自行修复;而非感染性坏死的组织,则对周围组织无影响。细菌之间的协同作用的主要机制是:

一、干扰宿主的防御反应

与需氧菌或兼性厌氧菌混合时,厌氧菌能抑制机体白细胞对需氧菌或兼性厌氧菌的吞噬作用。普雷沃菌和卟啉单胞菌对分叶核中性粒细胞(PMNs)杀死需氧菌有抑制作用。Namavar F, Verweij AM, Bal M(1983)研究了产黑色素厌氧杆菌对 PMNs 杀死需氧菌的抑制作用的影响,认为牙龈卟啉单胞菌对 PMNs 杀死需氧菌的抑制能力最强,而且,这种抑制作用只限于牙龈卟啉单胞菌的上清液中,其原因是上清液中含有两种因子:一个是耐热分子,分子量 < 3500 Da;另一个是不耐热分子,能部分失活补体系统。它们的存在使得白细胞对需氧菌的吞噬和杀死作用受到干扰和抑制。所以当这些细菌与需氧菌共同培养时,需氧菌的存活能力明显提高。

二、相互提供了不可缺少的营养物质

Grenier D, Mayrand D(1986)用薄层色谱仪和光谱吸收技术对牙龈卟啉单胞菌、产黑色素普雷沃菌与直肠沃廉菌(*Wolinella recta*)之间的营养关系进行了研究,结果显示:产黑色素普雷沃菌与 W. recta 之间存在着协同关系,前者产生甲酸盐刺激后者生长,而后者则产生血红素样化合物促进前者生长。研究还表明0.5μg/mL 的氯化血红素可使牙龈卟啉单胞菌生长旺盛,毒力增强,而氯化血红素的量减少时,牙龈卟啉单胞菌会变形,菌毛缺乏,毒力降低,无氯化血红素时,牙龈卟啉单胞菌几乎无毒力。

三、改善了局部环境

需氧菌常可提供较低的氧化还原电势,有利于厌氧菌的生长。

四、增加了细菌毒力

从化脓性尖周炎中分离出的细菌混合物能形成传播性脓肿(transmissible abscess),而慢性无症状的尖周炎病例中分离出的细菌混合物则不能形成此种脓肿。在混合感染中,如有卟啉单胞菌和普雷沃菌参与,就可形成典型的传播性脓肿;去除上述细菌,则不能形成这种脓肿;在传播性脓肿中,产黑色素普雷沃菌、不解糖卟啉单胞菌和微小消化链球菌是必需菌,当混合菌中有上述细菌存在时,形成的脓肿不能缩小或溶解。这些混合感染的细菌,如作单独接种时,其毒性很小。

五、共聚(co - aggregation)作用

卟啉单胞菌和普雷沃菌分别能与一株以上的 G^+ 菌发生共聚,其中作用较强的细菌有栖牙普雷沃菌(*P. dentocola*)、罗氏普雷沃菌(*P. loescheii*)和中间普雷沃菌,这些细菌是通过调节两个非共聚型细菌之间的关系而起着"共聚桥"作用。这种作用对细菌在口腔各个部位的附着和菌斑形成等方面可能有着很重要的意义,这种微聚体阻碍了宿主特异性抗体的作用和吞噬细胞的活性。

细菌之间的协同作用不仅存在于厌氧菌和需氧菌之间,而且存在于兼性厌氧菌和厌氧

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

菌之间，甚至在同属内也存在着明显的协同关系。单一厌氧菌的致病力是有限的，而细菌之间的协同作用是牙髓、尖周组织疾病发生发展的重要因素之一。因此，研究细菌之间的相互关系，探讨其与牙髓和尖周组织疾病之间的联系，可为临床牙髓和尖周组织疾病的诊断和治疗提供可靠的理论依据。

第四节 牙髓微生物的免疫学作用

在牙尖部釉质受损时，相应的髓角处的牙髓组织中的树突状免疫细胞可逐渐聚集并活化，对从牙本质小管侵入的细菌及其毒素起免疫反应。

牙齿一旦萌出后，OX6 + 细胞逐渐增加，并在冠髓的外周密度最高，在局部牙本质暴露处的下方，OX6 + 细胞的密度更高。许多细胞缺乏吞噬小体，故有学者认为这些细胞属于特定的树突状细胞，专门负责检测从牙本质小管内侵入的细菌抗原，而这些细胞常常使胞膜扩展形成胞浆突，伸入受感染的牙本质小管内。

树突状细胞(DC)参与了牙髓组织对入侵的细菌性抗原的免疫初期反应过程。

牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌、产黑色素普雷沃菌等是牙髓病感染灶中的重要厌氧菌，它们能产生内毒素脂多糖，内毒素对多种细胞如成纤维细胞有毒性作用，还可通过替代途径激活补体系统，导致尖周组织破坏。

尖周炎症发生发展的免疫学以及与细胞因子相互作用的机制示意图如下(图 8.62)：

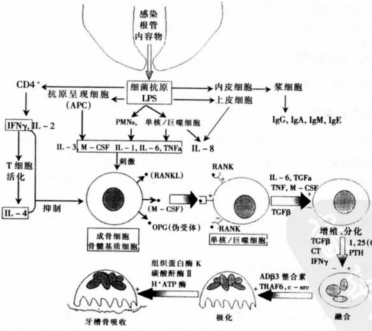


图 8.62 尖周炎症发展示意图

(倪龙兴)

参考文献

1. Bergenholtz G. Micro - organisms from necrotic pulp of traumatized teeth. Odontol Revy. 1974;25(4):347
2. Bergenholtz G. Micro - organisms from necrotic pulp of traumatized teeth. Odontol Revy. 1974;25(4):347
3. Carlsson J, Frolander F, Sundquist G. Oxygen tolerance of anaerobic bacteria isolated from necrotic dental pulps. Acta Odontol Scand. 1977;35(3):139
4. Carlsson J, Frolander F, Sundquist G. Oxygen tolerance of anaerobic bacteria isolated from necrotic dental pulps. Acta Odontol Scand. 1977;35(3):139
5. Main FA, Jarman TR, Righelato RC. Biosynthesis of exopolysaccharide by pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol. 1978;134:418
6. Zavistoski J, Dzink J, Onderdonk A, et al. Quantitative bacteriology of endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1980 Feb;49(2):171
7. Zavistoski J, Dzink J, Onderdonk A, et al. Quantitative bacteriology of endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1980 Feb;49(2):171
8. Fabricius L, Dahlen G, Holm SE, et al. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. Scand J Dent Res. 1982 Jun;90(3):200
9. Tanner AC, Visconti RA, Holdeman LV, et al. Similarity of Wolinella recta strains isolated from periodontal pockets and root canals. J Endod. 1982 Jul;8(7):294
10. Fabricius L, Dahlen G, Holm SE, et al. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. Scand J Dent Res. 1982 Jun;90(3):200
11. Tanner AC, Visconti RA, Holdeman LV, et al. Similarity of Wolinella recta strains isolated from periodontal pockets and root canals. J Endod. 1982 Jul;8(7):294
12. Kasper DL, Weintrub A, Lindberg AA et al. Capsular polysaccharides and LPS from two B. fragilis reference strains: chamical and immunochemical charicterization. J Bacteriol. 1983;153(2):991
13. Namavar F, Verweij AM, Bal M, et al. Effect of anaerobic bacteria on killing of Proteus mirabilis by human polymorphonuclear leukocytes. Infect Immun. 1983 Jun;40(3):930
14. Namavar F, Verweij AM, Bal M, et al. Effect of anaerobic bacteria on killing of Proteus mirabilis by human polymorphonuclear leukocytes. Infect Immun. 1983 Jun;40(3):930
15. Heimdahl A, von Konow L, Satoh T, et al. Clinical appearance of orofacial infections of odontogenic origin in relation to microbiological findings. J Clin Microbiol. 1985 Aug;22(2):299
16. Wilson M, Kamin S, Harrey W. Bone resorbing activity of purified capsular material from actinobacillus actinomycetemcomitans. J Periodont Res. 1985;20:484
17. Heimdahl A, von Konow L, Satoh T, et al. Clinical appearance of orofacial infections of odontogenic origin in relation to microbiological findings. J Clin Microbiol. 1985 Aug;22(2):299
18. Haapasalo M. Bacteroides buccae and related taxa in necrotic root canal infections. J Clin Microbiol. 1986 Dec;24(6):940
19. Grenier D, Mayrand D. Nutritional relationships between oral bacteria. Infect Immun. 1986 Sep;53(3):616
20. 张孝齐、杨聚才、田长星等. 26 例尖周炎及牙周炎的厌氧检查. 实用口腔医学杂志. 1986;2(4):219
21. 唐文杰、李春亚、南平等. 感染根管内厌氧菌的检测初步报告. 实用口腔医学杂志. 1986;2(3):183
22. Kamin S, Harrey W, wilson M et al. Inhibition of fibroblast proliferation and collagen synthesis by capsular material from actinobacillus actinomycetemcomitans. J Med Microbiol. 1986;22:24

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

23. Haapasalo M. Bacteroides buccae and related taxa in necrotic root canal infections. J Clin Microbiol. 1986 Dec;24(6):940
24. Grenier D, Mayrand D. Nutritional relationships between oral bacteria. Infect Immun. 1986 Sep;53(3):616
25. Yoshida M, Fukushima H, Yamamoto K, et al. Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals of teeth with periapical pathosis. J Endod. 1987 Jan;13(1):24
26. 何道生. 厌氧菌临床与实验室检查. 北京:中国人民解放军 304 医院. 1987:186
27. Harrey W, Kamin S, Meghji S, et al. Interleukin – 1 like activity in capsular material from huemophilus actinomycetemcomitans. Immunology. 1987;60(3):415
28. Yoshida M, Fukushima H, Yamamoto K, et al. Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals of teeth with periapical pathosis. J Endod. 1987 Jan;13(1):24
29. 唐安尧. 感染根管内厌氧菌的研究. 第四军医大学硕士学位论文. 1988
30. Wilson M, Meghji S, Harvey W. Effect of capsular material from haemophilus actinomycetemcomitans on bone collagen synthesis in vitro. Microbiol. 1988;54:181
31. Shah HN, Collins MD. Proposal for reclassification of Bacteroides asaccharolyticus, Bacteroides gingivalis, and Bacteroides in a new genus, Porphyromonas. Int J Syst Bacteriol. 1988; 38:128
32. Brook I. Effect of eocapsulated bacteroides assacchariolyticus and bacteroides fragilis on growth of aerobic and facultative bacteria in mixed infections. J Surg Res. 1989;47(1):92
33. 唐安尧、史俊南、何道生等. 感染根管内厌氧菌的研究——厌氧菌的分离率及其优势菌. 实用口腔医学杂志. 1989;5(2):105
34. 王祖农. 微生物学词典. 北京:科学出版社. 1990
35. 张郁、荫俊、史俊南等. 内毒素对破骨细胞性骨吸收和成骨细胞介导作用的影响. 实用口腔医学杂志. 1990:6(增):222
36. 许丽华、薛毅、史俊南等. 免疫和非免疫 Balb/c 小鼠对实验性牙龈拟杆菌感染的影响. 实用口腔医学杂志. 1990:6(增刊):237
37. 倪龙兴、史俊南、孙叶芳等. 产黑色素拟杆菌和具核梭杆菌在实验动物感染中的相互作用. 实用口腔医学杂志. 1990;6(增刊):235
38. 唐安尧、史俊南、何道生等. 感染根管内厌氧菌的研究——厌氧菌的药敏试验. 临床口腔医学杂志. 1990;6(1):6
39. 唐安尧、史俊南、何道生等. 感染根管内厌氧菌的研究——厌氧菌代谢产物的气相色谱分析. 实用口腔医学杂志. 1990;6(1):32
40. 唐安尧、史俊南、何道生等. 感染根管内厌氧菌的研究——感染根管内厌氧菌 DNA G + C mol% 测定. 口腔医学纵横. 1990;6(4):195
41. 唐安尧、史俊南、何道生等. 感染根管内厌氧菌的电子显微镜观察. 实用口腔医学杂志. 1990;6(增刊):231
42. Tolo K, Helgeland K. Binding components: a virulence factor in actinobacillus actinomycetemcomitens. Oral Microbiol Immunol. 1991;6(6):373
43. 荫俊、张郁、焦炳华等. 牙髓拟杆菌 ATCC35406 脂多糖的提纯和鉴定. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1991:1(2):80
44. 许丽华、薛毅、史俊南. 中间型拟杆菌单克隆抗体的制备及血清群分析. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1991:1(2):78
45. 张郁、荫俊、史俊南等. 具核梭杆菌内毒素对人牙周膜成纤维细胞和 L929 细胞的细胞毒作用. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1991;1(1):26
46. Kroll JS. The genetics of encapsulation in haemophilus influenzae. Infect Dis. 1992;165(suppl1):93

47. Meghji S, Henderson B, Nair S, et al. Inhibition of bone DNA and collagen production by surface – associated material in the pathology of periodontal disease. J Periodontol. 1992;63:736

48. Shah HN, Gharbia SE, O'Toole CM. Assessment of the relative cytotoxicity of porphyromonas gingivalis cell, products and components on human epithelial cell line. J Periodontal. 1992;63(1):44

49. Meghji S, Wilson M, Henderson B, et al. Anti – proliferation and cytotoxicity of surface associated material from periodonto pathogenic bacteria. Archs Oral Biol. 1992;37(8):637

50. 张郁、萌俊、史俊南等. 牙髓拟杆菌内毒素对人牙髓和牙周膜成纤维细胞生长抑制的体外研究. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1992:2(1):18

51. 萌俊、张郁、焦炳华等. 四株口腔厌氧菌内毒素脂多糖的化学组分研究. 1992:2(4):193

52. 萌俊、余伟明、张郁等. 四株口腔厌氧菌内毒素对集落刺激因子的诱导作用. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1992:2(4):197

53. 萌俊、余伟明、张郁等. 四株口腔厌氧菌内毒素对白介素 – 1(IL – 1)的体外诱导活性. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1992:2(4):200

54. 萌俊、余伟明、张郁等. 口腔厌氧菌内毒素对肿瘤坏死因子(TNF)的诱导活性. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1992:2(4):203

55. 萌俊、余伟明、张郁等. 四株口腔厌氧菌内毒素对小鼠血清干扰素的诱生作用. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1992:2(4):206

56. 张郁、萌俊、史俊南等. 三株产黑色素类杆菌内毒素对人牙髓、牙周膜成纤维细胞细胞毒作用. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1992:2(4):209

57. 张郁、萌俊、史俊南等. 内毒素对人牙髓、牙周膜成纤维细胞 DNA 含量的影响. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1992:2(4):213

58. 张郁、萌俊、史俊南等. 内毒素对人牙周膜成纤维细胞超微结构的影响. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1992:2(4):216

59. 张郁、萌俊、史俊南. 尖周肉芽组织中内毒素含量检测及其与临床症状间的关系. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1992:2(4):226

60. 萌俊、张郁、焦炳华等. 具核梭杆菌 ATCC25586 脂多糖的提纯和鉴定. 临床口腔医学杂志. 1992;8(4):191

61. 薛毅、许丽华、谭巨莲等. 牙髓紫叶啉杆菌的分离、培养与鉴定. 中华医学检验杂志. 1992;15(6):358

62. 薛毅、李斌、谭巨莲等. 牙髓卟啉菌血清学特征分析. 中国微生态学杂志. 1992;4(2):15

63. Rubright WC, Johnson W, Spivey JD, et al. A comparison of three methods for estimating dental plaque removal individual teeth. Oral Microbiol Immunol. 1992;7:187

64. 赵守亮、刘智广、孙叶芳等. 牙龈卟啉菌荚膜的提取、纯化. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1993;3(3):139

65. Lee CY. Cloning of genes affaction capsule expressing in staphylococcus aureus strain. Mol Microbiol. 1992;6(11):1515

66. 赵守亮、史俊南、肖明振. 三种口腔厌氧菌荚膜对成纤维细胞 L929 的毒性作用. 实用口腔医学杂志. 1993;9(4):263

67. Helgeland K, Nordby B. Cell cycle specific growth inhibitory effect on human gingival fibroblasts of a toxin isolated from the culture medium of actinobacillus actinomycetemcomitans. J Periodont Res. 1993;28:161

68. 许丽华、薛毅、史俊南. 牙龈类杆菌致病性的动物实验研究. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1993:3(3):137

69. 倪龙兴、史俊南、杨聚才等. 感染根管内几株优势菌的致病性. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1993;3

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

(1):21

70. 赵守亮、刘智广、孙叶芳等. 牙龈卟啉菌荚膜的提取、纯化. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1993;3(3):139

71. 赵守亮、陈建元、史俊南等. 三种根管内厌氧菌荚膜对成纤维细胞 L929 的毒性作用. 实用口腔医学杂志. 1993;9(4):263

72. 倪龙兴、刘智广、陈镔复等. 牙髓卟啉菌和牙龈卟啉菌外膜蛋白及膜泡的氨基酸组成分析. 第四军医大学学报. 1993;14(2):147

73. 赵守亮、史俊南、肖明振等. 三种口腔厌氧菌荚膜对人牙龈成纤维细胞的生长抑制. 口腔医学纵横. 1994;10(4):204

74. 许丽华、史俊南、刘彦仿等. 血清牙龈类杆菌抗体水平与牙周组织炎症程度的关系. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1994:4(2):72

75. 薛毅、许丽华、史俊南. 牙源性脓肿标本中的产黑色素类杆菌群菌株分离鉴定. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1994:4(1):7

76. 薛毅、修贺明、许丽华等. 牙龈卟啉杆菌的分离培养与鉴定. 中国微生态学杂志. 1994;6(1):38

77. 赵守亮、史俊南、肖明振等. 三种口腔厌氧菌荚膜对人牙龈成纤维细胞的生长抑制作用. 口腔医学纵横. 1994;10(4):204

78. 倪龙兴、史俊南、陈镔复. 几株口腔厌氧菌胞外膜泡、外膜蛋白复合物的提取. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1994;4(1):17

79. 倪龙兴、史俊南、陈镔复. 细菌胞外膜泡的电镜观察. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1994;4(1):19

80. 倪龙兴、史俊南、陈镔复. 细菌膜泡、外膜蛋白复合物的十二烷基磺酸钠-聚丙烯凝胶电泳分析. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1994;4(1):24

81. 倪龙兴、史俊南、陈镔复. 细菌膜泡、外膜蛋白复合物的氨基酸组成分析. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1994;4(1):27

82. 倪龙兴、史俊南、陈镔复. 牙龈卟啉菌的胰酶样蛋白酶(TLP)检测. 牙体牙髓牙周病学杂志,1994;4(1):21

83. 倪龙兴、史俊南、陈镔复. 牙龈卟啉菌 381 胞外膜泡中的胰酶样蛋白酶的分离纯化. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1994;4(4):198

84. 刘鲁川、吉昌华、史俊南. 牙龈卟啉菌特异基因片段的体外扩增和鉴定. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1994;4(3):139

85. 刘鲁川、吉昌华、史俊南. 牙龈卟啉菌核酸探针的制备、鉴定. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1994;4(4):200

86. 赵守亮、史俊南、肖明振. 牙龈卟啉菌荚膜的热敏性. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1995;5(2):85

87. Ueda N, Nishihara T, Ishihara T, et al. Role of prostaglandin in the formation of osteoclastes induced by capsular like polysaccharide antigen of actinobucillus actinomycetemcomitans strain Y4. Oral Microbiol Immunol. 1995;10:69

88. 许丽华、薛毅、史俊南等. 侵入牙周病变组织中的牙龈类杆菌. 中华口腔医学杂志. 1995:30(4):212

89. 赵守亮、史俊南、肖明振. 牙龈卟啉菌荚膜的热敏感性. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1995;5(2):85

90. 赵守亮、史俊南、肖明振. 三种口腔厌氧菌荚膜的氨基酸组成和 SDS-PAGE. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1995;5(2):83

91. 赵守亮、史俊南、肖明振. 荚膜对人牙周膜成纤维细胞超微结构的影响. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1995;5(2):87

92. 倪龙兴、刘智广、史俊南等. 细菌胞外膜泡提取法的比较和改良. 第四军医大学学报. 1995;16

(2):158
93. 倪龙兴、史俊南、陈镔复. 牙龈卟啉菌381胞外膜泡中的胰酶样蛋白酶的理化性质测定. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1995;5(3):139
94. 刘鲁川、史俊南、吉昌华. 牙龈卟啉菌特异DNA片段的分子克隆. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1995;5(3):149
95. 刘鲁川、史俊南、吉昌华. 牙龈卟啉菌核酸探针在临床尖周炎检测中的应用. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1995;5(3):154
96. 刘鲁川、史俊南、吉昌华. 牙龈卟啉菌核酸探针在临床牙周炎检测中的应用. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1995;5(3):156
97. 刘鲁川、史俊南、吉昌华. 非核素标记牙龈卟啉菌核酸探针及其对比研究. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1995;5(3):152
98. 薛毅、修贺明、许丽华等. 胶体金标记单克隆抗体在牙龈卟啉杆菌检测中的应用. 中国微生态学杂志. 1995;7(6):45
99. 赵守亮、史俊南、肖明振. 3种口腔厌氧菌荚膜的氨基酸组成和SDS－PAGE. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1995;5(2):83
100. 赵守亮、史俊南、肖明振. 三种口腔厌氧菌荚膜对人周膜成纤维细胞在牙根面上再附着的影响. 中华口腔医学杂志.1996;31(1):19
101. 赵守亮、史俊南、肖明振等. 荚膜对人牙周膜成纤维细胞在牙根面上附着的影响. 中华口腔医学杂志. 1996;31(1):19
102. 倪龙兴、史俊南、刘智广. 牙龈卟啉菌W50膜泡中牙龈毒素的纯化和毒理学研究. 中华口腔医学杂志. 1996;31(2):95
103. 张亚庆、肖明振、赵守亮. 放线共生放线杆菌表面相关物质对人牙龈成纤维细胞的增殖抑制作用. 牙体牙髓牙周病学杂志.1998;8(2):123
104. 赵守亮、史俊南、肖明振. 厌氧菌荚膜对破骨细胞形成和破骨能力的影响. 牙体牙髓牙周病学杂志.1999;9(3):188
105. 王胜朝. 人CD14基因重组、真核表达及其在牙髓、牙龈炎中作用的实验研究. 第四军医大学博士学位论文. 2000
106. 张亚庆、肖明振、赵守亮. 放线共生放线杆菌表面相关物质对人牙龈成纤维细胞DNA合成和细胞周期的影响. 牙体牙髓牙周病学杂志. 2001;11(4):231
107. 张亚庆、肖明振、赵守亮. 放线共生放线杆菌表面相关物质对人牙周膜成纤维细胞在牙根片上附着的影响. 牙体牙髓牙周病学杂志. 2001;11(5):290
108. 姜明. 类脂A结合肽的筛选和修饰及其在内毒素中和过程中的作用. 第四军医大学博士学位论文. 2003

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

第九章　牙髓免疫学

第一节　感染牙髓中的抗原

一、感染牙髓的病原微生物

(一)感染根管中的主要病原菌

龋病是常见病和多发病,与牙髓、尖周病关系密切的主要是龋齿和牙菌斑中微生物及其毒素的抗原物质。而感染根管中的病原微生物是以厌氧菌(包括专性厌氧菌和兼性厌氧菌)为主体的混合菌属,其厌氧菌又以 G^- 杆菌为主。

感染根管中的主要病原菌是能够产生黑色素的口腔厌氧菌(black - pigmented oral anaerobes, BPOA)和不产黑色素的口腔厌氧菌。

(二)感染牙髓内微生物的协同作用

感染根管内的菌群是以厌氧菌为主体的混合感染菌群。在感染根管内的微生物中,细菌的协同作用可能是牙源性感染的关键因素。非致病共生菌提供了生长因素,同时也通过它们的代谢产物降低了氧化还原电位,给感染创造了一个更为合宜的环境。

纯培养的产黑色素厌氧杆菌无致病性,当它与其他细菌混合感染时方显致病性,其致病力可因其他细菌的存在而增强。例如将纯培养的产黑色素厌氧杆菌或脆弱类杆菌注射到实验动物皮下不引起感染,但与其他细菌,如需氧菌、韦氏菌、消化链球菌等一起注射时就可引起严重感染,这是因为产黑色素厌氧杆菌的大多数菌株生长需要血素,多数菌株需要萘醌,这需要活体中口腔内其他常住菌的供给,所以产黑色素厌氧杆菌的致病能力由于其他菌的存在而增强。又如脆弱类杆菌,它可产生溶解胶原的酶,而活体中的其他细菌则可利用胶原酶的终末产物。因此,细菌间的相互作用和共生作用在根管内混合感染中具有重要意义。

二、内毒素

G^- 菌是感染牙髓的优势菌, G^- 菌的抗原主要是菌体抗原,其菌体抗原的有效成分为内毒素(endotoxin, ET),因此,内毒素是其中的主要致病原或免疫原。

内毒素是菌体的结构成分,是一类具有高度生物活性的物质,其化学成分为磷脂 - 多糖 - 蛋白质(phospholipid - polysaccharide - protein)复合物。细胞壁中的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是内毒素的主要成分。LPS 是由特异性多糖、非特异性核心多糖和类脂 A 三部分组成。类脂 A 为一种特殊糖磷脂,是 LPS 的核心成分,所有 LPS 的活性基因几乎都集中在类脂 A 上。类脂 A 具有内毒素的主要毒性,而多糖位于细菌细胞壁的最外层,与细菌的特异性有关。各种 G^- 菌的类脂 A 的化学成分和结构可有差异,但不同的 G^- 菌感染时,由内毒素引起的毒性作用大致相同。

(一)内毒素的免疫原性

机体免疫反应是抗原和一个复杂的细胞系统间相互作用而诱发的。作为异质性大分子的内毒素有很强的免疫原性,其分子上三个性质不同的区域,分别产生三种不同类型的抗体,即抗侧链抗体、抗核心多糖抗体和抗类脂 A 抗体。决定免疫特异性的抗原决定簇携带在多糖侧链上,大部分的抗体就是针对它形成的,抗 O 抗体的保护作用很强,但只限于对同型菌株有效。核心区和类脂 A 区与不同种属有免疫学交叉反应,试图用于临床免疫治疗的抗内毒素抗体就是针对这部分的。

(二)内毒素的生物学活性

内毒素的生物学活性是多方面的,其中主要是它的毒性和免疫学活性。

1.内毒素的毒性

内毒素进入血循环后可立即与体液成分和细胞成分起作用。当与细胞成分起作用时,产生有毒的中间产物,或使细胞黏附聚集,或致胞膜损伤和细胞溶解,当与体液成分起作用时,形成的中间产物又可影响细胞成分的功能和加剧体液成分的改变。因此,内毒素与体液、细胞成分的相互作用是极为复杂的,其毒性作用的表现是导致机体出现一系列病理生理改变。临床出现的症状往往也是机体多数组织器官出现变化的综合表现。例如,发热反应、内毒素血症与内毒素休克、血管舒缩机能紊乱、弥散性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC)和施瓦兹曼现象(Shwartzman phenomenon)等。

(1)发热反应:人体对内毒素的致热反应极为敏感,1～5ng/kg 即可引起发热。一般在注射后 2h 内体温上升,维持 4h 左右。现已证明,按每公斤体重的最小致热剂量比较,人和家兔的内毒素致热剂量大致相等,人和家兔的热反应阈值大致相当。

(2)内毒素血症与内毒素休克:当大量内毒素进入血液时,则可引起内毒素血症。因内毒素可作用于血小板、白细胞、补体系统、激肽系统等,引起组胺、5－羟色胺、前列腺素、激肽等血管活性介质释放,使小血管收缩和舒张功能紊乱而导致微循环障碍,致使有效循环血量减少,血压下降,严重时则形成以微循环衰竭和低血压为特征的内毒素休克。

(3) 糖代谢紊乱:先发生高血糖,转而为低血糖,大量糖原消耗,可能与肾上腺素大量分泌有关。

(4)弥散性血管内凝血(DIC):是由于内毒素激活凝血系统,包括内源性凝血途径和外源性凝血途径,使血液凝固异常升高,生成大量纤维蛋白沉积于微循环内形成栓塞所致。

(5)施瓦兹曼现象(Shwartzman phenomenon):可能是由内毒素引起的 DIC 的一种特殊形式。将内毒素注入动物皮下,次日再以内毒素静脉注射,数小时后第一次注射的局部皮肤出现坏死。如果二次均为静脉注射内毒素,就可出现 DIC。现认为第一次剂量的内毒素封闭了单核吞噬细胞系统,以致不能消除第二次注入的内毒素,故发生这种反应。亦可用炭粒代替第一次内毒素剂量以阻断单核吞噬细胞系统,或以肾上腺皮质类固醇处理,也可得同样结果。

2.内毒素的免疫学活性

内毒素的免疫学活性主要表现在内毒素能刺激机体的免疫系统,激活补体和各种吞噬细胞,并诱导靶细胞释放各种细胞因子而发挥作用。

(1)内毒素激活补体系统

内毒素可经经典和替代途径激活补体,活化的补体可使粒细胞、单核细胞和内皮细胞

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

激活。粒细胞经由补体激活后,可导致:①发热的介质释放;②溶酶体酶的分泌;③产生过氧化阴离子、过氧化氢和氢氧基等。可造成血管壁的严重损害,使膜通透性增加,随之出现水肿,进而由于中性粒细胞凝集,微循环出现严重变化,导致各种组织器官的功能改变。

(2)内毒素作用靶细胞释放细胞因子

内毒素作用的靶细胞有单核-巨噬细胞、B淋巴细胞、粒细胞、血小板、成纤维细胞、内皮细胞等,其中单核-巨噬细胞是内毒素作用的主要靶细胞。

实验研究证明,内毒素作用于靶细胞,诱导其分泌多种细胞因子,其中主要有肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素(ILs)、集落刺激因子(CSFs)和干扰素(IFNs)等,从而借助这些细胞因子在局部和(或)随血液播散至机体其他部位而发挥效应。而且,通过这些细胞因子增强机体抗感染和抗肿瘤的能力,使内毒素成为一种很有意义的免疫增强剂,尤其是LPS的抗肿瘤作用很早就引起人们的重视,现已应用于临床抗肿瘤治疗。

内毒素对机体免疫系统的影响具有双重性。一方面可以激活机体局部和整体免疫系统参与清除细菌感染;另一方面如果细菌感染严重,大量细菌在血中繁殖,使循环血中堆积大量的LPS,并与机体各部位的单核-巨噬细胞接触,引起细胞因子的大量产生,则有可能导致感染性休克。

鉴于内毒素的毒性作用和免疫学活性功能,各国学者都致力于研究如何降低内毒素的毒性而保留其抗感染、抗肿瘤等免疫增强活性;70年代以后,在搞清楚LPS,尤其是类脂A的分子结构与功能的关系后,开始在分子水平上有选择地对类脂A的化学结构中特定的基团进行改造,或人工化学合成各种类脂A的前体或衍生物,其中最有意义的衍生物之一是单磷酸类脂A(MPLA)。MPLA的毒性作用很弱,具有较强的免疫增强作用,是一种高效的免疫佐剂;可激活各种免疫活性细胞,诱导产生各种免疫活性因子;激活补体系统、巨噬细胞系统和外周血粒细胞系统,增强巨噬细胞以及中性粒细胞的吞噬能力和趋化游走能力;提高宿主的抗感染、抗肿瘤能力等。目前认为,MPLA是一种有很大发展前景的生物制剂。MPLA的局部应用效应是否可应用于牙髓、尖周和牙周组织疾病的防治还有待于研究。

(三)LPS结合蛋白受体

LPS结合蛋白(LPS binding protein, LBP)是由肝细胞合成的一种急性期蛋白,能识别LPS的类脂A部分,并与LPS有很高的亲和性。LPS结合蛋白受体是能与LPS-LBP复合物结合并发挥功能的膜表面抗原之一。

因类脂A是LPS的主要生物活性部分,在LPS诱导单核-巨噬细胞分泌细胞因子的过程中,首先是由LPS与巨噬细胞表面的受体结合而使其活化。

Wright SD, Romos RA, Tobias PS等(1990)发现单核-巨噬细胞膜表面分化抗原之一的CD14能与LPS-LBP复合体结合发挥受体功能。而且他在用大肠杆菌(Ec)LPS刺激人单核细胞时发现,LPS与单核细胞膜表面的结合可被抗CD14抗体阻断,同时抑制单核细胞TNF-α的分泌,但这种作用必须在有血清的参与下才能发生。因此认为LPS诱导单核细胞活化与CD14以及血清中的LPS结合蛋白有关。

研究证实:单核-巨噬细胞表面存在针对LPS-LBP复合体受体。此受体则是细胞膜蛋白家族成员之一的CD14。单核细胞、巨噬细胞能表达CD14,而未激活的粒细胞、T细胞、B细胞则不表达CD14。细胞表面分化抗原之一的CD14可能作为受体参与LPS刺激单核细胞的活化过程。

CD14是LPS和LPS-LBP在细胞膜表面的受体，抗CD14抗体能够阻断LPS-LBP与单核细胞表面的结合，抑制细胞因子的产生，因此，CD14在LPS诱导单核-巨噬细胞分泌细胞因子的过程中起着重要作用。研究表明LPS可以增加体外培养的人牙髓细胞合成血管内皮生长因子，其机制可能是通过可溶性CD14介导，并且通过转录因子AP-1调控。另外，LPS刺激体外培养的人牙髓细胞表达白介素-6，该过程依赖CD14，并在翻译水平受CD14调控，提示应用免疫调节因子综合治疗LPS引起的牙髓炎症可能是有效的。

巨噬细胞(MΦ)具有多种功能，是维持机体正常的防御和生理平衡必不可少的细胞，是内毒素作用的主要靶细胞。Okiji T, Kawashima N, Koska T等(1992)报道正常大鼠牙髓中的MΦ按Ia抗原表达能力可分为两类，即Ia^+和Ia^-的MΦ。

牙髓中Ia抗原表达细胞有MΦ样细胞和树突状细胞样细胞，而且，MΦ在CD14表达上也存在高表达和低表达两种类型。牙髓中的MΦ可能来源于单核细胞，经分化成熟为不同类型的MΦ。

(四)感染牙髓病原菌内毒素的作用

由于感染根管内厌氧菌内毒素的检出，许多研究发现感染根管中的内毒素活性与牙髓、尖周病的发病和临床症状密切相关，从而使内毒素在牙髓、尖周病中的致病作用日益受到重视。研究表明内毒素LPS能在30 d内引起狗牙尖周病变；另外，在伴有严重疼痛的牙髓炎患者牙髓组织中的检出率明显高于无症状的牙髓炎患者的牙髓组织，表明内毒素在人牙髓疾病的病理变化过程中可能起重要作用。

在感染根管内的厌氧菌中，产黑色素的口腔厌氧菌(BPOA)和具核梭杆菌(Fn)是优势致病菌。细菌的种属不同，其内毒素结构、生物学活性和毒性也不同。如BPOA LPS的类脂A中磷含量低于具核梭杆菌Fn LPS。

荫俊(1992)在实验中给小鼠腹腔注射Fn和BPOA LPS后，发现经BCG卡介苗致敏的小鼠在注射1.0μg LPS时血清中即可出现TNF，并随LPS剂量增加而逐渐升高，但Fn LPS的诱导活性显著高于BPOA LPS。

张郁(1992)报道在相同浓度下，BPOA LPS对细胞DNA含量的影响明显小于大肠杆菌(Ec)和Fn的作用。这些结果说明感染根管优势致病菌LPS不仅与Ec有不同之处，而且感染根管优势致病菌LPS之间亦有差异。

侯本祥(1996)研究证实：Fn、BPOA、Ec的LPS在5%人血清的参与下，能诱导体外分离培养的人外周血单核细胞产生TNFα、IL-6和IL-8等细胞因子，三种LPS对单核细胞诱导产生细胞因子的能力，依次为Fn > Ec > BPOA，所产生的细胞因子则为IL-8 > TNFα > IL-6，三种LPS诱导细胞因子的产生均有明显的血清依赖性(serum dependence)和浓度依赖性(dose dependence)，且其诱导作用均受抗CD14抗体的影响。

结果说明Fn、BPOA的LPS在诱导单核细胞释放细胞因子的作用机制中与Ec相同，它们依赖单核细胞膜表面受体CD14。同时抗CD14抗体在血清的协同作用下，能有效地抑制或降低LPS刺激单核细胞分泌细胞因子。这不仅为牙髓、尖周和牙周组织感染性病变中细胞因子的来源提供了佐证，而且表明应用抗CD14抗体或减少单核-巨噬细胞CD14的表达，有可能减轻LPS对牙髓、尖周和牙周组织的病理损害。

关于LPS对牙髓细胞的直接毒性作用的研究已有报道。Pinero GJ, Kiatpongsah S, Hutchins MO等(1983)研究发现，在低浓度下内毒素对牙髓成纤维细胞的增殖和基质合成具

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

有刺激作用，促进细胞分裂和基质合成；而在高浓度下，表现出对细胞的明显毒性作用，以致引起细胞坏死。Nakane A Yoshida T, Nakata K 等(1995)报道 LPS 在 1mg/mL 不影响体外培养的人牙髓细胞 DNA 和蛋白的合成，10 mg/mL 使 DNA 合成增加，蛋白质合成减少，100 mg/mL抑制 DNA 和蛋白的合成；碱性磷酸酶活性没有改变。表明 LPS 对牙髓细胞的影响与其本身的浓度有关。

侯本祥(1996)在证实 Fn、BPOA 的 LPS 具有诱导单核细胞产生细胞因子能力的基础上，进一步探讨了单核细胞介导下 LPS 对牙髓细胞的作用，结果显示，经 LPS 刺激的单核细胞培养上清在 1～3d 内对人牙髓细胞生长具有显著的促进作用，并且低浓度(1ng/mL)LPS 刺激的单核细胞培养上清对牙髓细胞的促生长作用大于高浓度(10ng/mL)的 LPS，提示单核细胞介导下 LPS 对牙髓细胞的作用不仅与单核细胞产生的细胞因子有关，而且受到 LPS 自身和其他因素的影响。但是，LPS 刺激的单核细胞培养上清对牙髓细胞 ALP 活性则有抑制作用，而抗 CD14 抗体可阻断单核细胞介导下 LPS 对牙髓细胞 ALP 活性的抑制。

采用 Ec LPS(5mg/mL)涂布大鼠磨牙穿髓点 30 min，出现了内毒素性牙髓炎症。早期表现为急性化脓性牙髓炎，1 周后炎症扩散至大部分冠髓，5 周时牙髓出现大部分坏死。Ia 抗原表达细胞在 LPS 作用后 3d 数量最多，以后逐渐下降，而 MΦ 则在整个过程中均有大量浸润。研究表明：MΦ 在内毒素诱发牙髓炎症中起着重要作用。内毒素性的牙髓炎症是牙髓出现了以非特异性免疫为基础的抗原特异性免疫反应。若不及时去除抗原物质，最终会导致组织坏死。在内毒素性炎症牙髓组织中还有 TNF－α、IL－1、IL－8 和 IL－6 等细胞因子的表达，它们主要位于炎症浸润区内或其周围聚集，产生一系列的生物学效应。例如，增加血管通透性，趋化中性粒细胞，增强中性粒细胞与血管内皮细胞的黏附性，诱发其他细胞因子释放，参与和导致炎症的发生和发展。

内毒素是具有毒性和免疫学活性的致病原。当内毒素进入血液后，则可导致机体出现一系列的病理变化。通常认为内毒素是引起 TNF 释放的启动剂，是刺激机体 TNF 升高的敏感物质。TNF 在内毒素致病中具有重要意义。为了观察内毒素血症致各组织特别是牙髓组织的病理学改变，以及抗 TNFα 抗体对实验动物是否有保护作用，文玲英、吴兴裕、朱明等(1997)将 28 只大耳白兔随机分为 4 组，即对照组、内毒素组、抗体保护组和无关抗体组，每组 7 只，以小剂量大肠杆菌内毒素(0.1mg/kg)分次对兔耳进行静脉注射，复制病理性氧供依赖性模型。以 ELISA 测定血中 TNF 浓度。采用组织学、组织化学和免疫组化法评价牙髓形态学特征。结果，内毒素组与无关抗体组的牙髓组织有充血、水肿、渗出、弥散性血管内凝血等病理变化，而对照组和抗体保护组形态正常；内毒素组血浆中 TNF 浓度明显高于对照组($P<0.01$)，抗体保护组的 TNF 浓度则明显低于无关抗体组($P<0.01$)。说明内毒素血症可致牙髓组织的病理学改变，抗 TNFα 抗体可以阻断其病变的发生和发展，具有临床应用前景。

三、修饰的自身抗原

修饰的自身抗原是正常情况下的自身组织在感染、药物、电离辐射等因素作用下，使其结构发生改变，形成新的抗原决定簇产生的抗原。这种抗原也可引起免疫应答，造成免疫损害。

健康的牙髓对机体本身不具有抗原性，而对异体、异种来说，健康牙髓本身也有抗原

性。由于牙髓所含的组织相容性抗原比其他组织少,故牙髓的抗原性较其他组织弱。变性的牙髓则可作为抗原的一种来源,不仅可诱发尖周组织的免疫反应,还可诱发全身性的免疫应答。

(一)病变牙髓的抗原性

病变牙髓可作为抗原致敏机体。Dietz VH(1952)曾将病变牙髓浸出物作为抗原进行皮内实验,发现有尖周病的患者中40%立即出现皮肤反应,而无尖周病变者中只有10%出现阳性皮肤反应。Stabholz A 和 Mcarthur WP(1978)以超声处理过的坏死牙髓作为抗原,用毛细管法做末梢白细胞游走抑制试验,发现有尖周病灶的患者白细胞游走抑制率显著增高。而感染坏死牙髓诱发免疫反应的抗原是感染根管内的细菌及其毒素。

(二)药物变更牙髓的抗原性

某些牙髓治疗的药物可变更或修饰牙髓组织,使其具有抗原性。在众多牙髓治疗药物中甲醛甲酚合剂(FC)是最有代表性的药物。Nishida O, Okada H, Kawagoe K 等(1971)曾用8%甲醛液处理兔的自身牙髓组织致敏动物,产生了高效价的特异性抗体。Heroeg 也将未处理和甲醛处理的牙髓提取物注入兔内,发现有抗甲醛提取物的抗体。在 FC 是否使牙髓变性的研究中,Block 等进行了系列动物实验,从体液免疫反应到细胞免疫反应均证实了 FC 是半抗原,牙髓组织可作为蛋白载体,以适当的方式与 FC 结合,最终导致牙髓组织变性而具有抗原性。同时,Shinoda S, Murayama Y, Okada H(1986)进一步研究发现,FC 使牙髓变性后出现了正常牙髓不具有的抗原决定簇。甲酚可能是 FC 中的主要半抗原成分。薛毅等采用免疫学方法,模拟临床应用手段进行研究,结果证实,FC 是一种半抗原制剂,可与牙髓、根管内的载体蛋白结合,形成完全抗原,经根管系统致敏机体;FC 合剂中甲酚是主要的半抗原成分,从而提出改良 FC 配方,减少甲酚含量的必要性。

然而,因动物或宿主的免疫反应具有变异性,对任何药物的免疫反应潜力,动物和动物之间不尽相同,而且,根管的牙髓组织可由于许多因素的改变而不具有抗原性,以及实验所使用药物的剂量、途径等因素的影响等,使这些研究结果有其局限性。在 FC 对大鼠巨噬细胞黏附塑料表面的作用的体外实验中,发现 FC 具有抑制巨噬细胞的功能,可能在牙髓和尖周疾病中调节免疫和炎症反应。因此,FC 在牙髓和尖周病的免疫反应中究竟起何种作用尚需进一步研究。

因甲醛甲酚合剂不仅对尖周组织有毒害作用,而且可能给机体和局部组织带来免疫性损害,许多学者认为,从严格科学观点看,必须减少 FC 的毒性和刺激性,从生物学观点看,FC 和多聚甲醛是不宜使用的。

(文玲英)

第二节　牙髓中的免疫细胞

一、免疫细胞和免疫活性细胞

免疫细胞(immunocyte)是一类参与免疫应答或与免疫应答有关的细胞。

免疫活性细胞(immunocompetent cell, ICC)是指淋巴细胞中的 T 细胞和 B 细胞,这两群细胞均有特异性抗原受体,接受抗原刺激后能发生活化、增殖和分化,产生特异性免疫应

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

答。免疫活性细胞也称为抗原特异性淋巴细胞。

二、免疫细胞的分类

免疫细胞中,根据其在免疫应答过程中所起的不同作用可将其分为3类:

(一)淋巴细胞:是在免疫应答过程中起核心作用的细胞,是人体内数量较多的细胞群体之一。淋巴细胞是一个不均一的复杂群体,包括许多具有不同免疫功能的亚群,T细胞和B细胞是其中最主要的两个亚群。其他淋巴细胞有NK细胞和K细胞。

(二)辅佐细胞(accessory cell, A cell):是在免疫应答过程中起重要辅佐作用的细胞,它们能捕获和处理抗原,以及将此抗原提呈给免疫活性细胞。单核吞噬细胞和树突细胞是其中的主要细胞。

(三)其他细胞如各种粒细胞和肥大细胞等,多参与免疫应答的某一环节。

淋巴细胞和单核吞噬细胞是免疫活动中最直接相关的两类细胞。

三、T细胞和B细胞

(一)T细胞和B细胞的来源

T细胞和B细胞均由骨髓中的多能干细胞分化成淋巴细胞后,再进一步分化而来。

淋巴干细胞可在骨髓中分化为前T细胞和前B细胞。

前T细胞进入胸腺分化发育为成熟的T细胞,即胸腺依赖性淋巴细胞(thymus dependent lymphocyte),简称T淋巴细胞(T lympocyte)或T细胞。T细胞接受抗原刺激后活化、增殖和分化成有效应T细胞,担负细胞免疫功能。

前B细胞在哺乳类动物的骨髓或在鸟类的腔上囊分化发育为成熟的B细胞,故称骨髓依赖性淋巴细胞(bone marrow dependent lymphocyte)或囊依赖性淋巴细胞(burse dependent lymphocyte),均简称为B淋巴细胞或B细胞。B细胞接受抗原刺激后活化、增殖和分化为浆细胞,然后由浆细胞产生特异性抗体,发挥体液免疫功能。

(二)T细胞和B细胞的区别

T、B细胞在光镜下均为小淋巴细胞,形态上难以区别。在扫描电镜下观察,多数T细胞表面光滑,较少绒毛突起;而B细胞表面较为粗糙,有较多绒毛状突起。但这一区别不能作为T、B细胞的特征标志。

淋巴细胞的表面标志是细胞表面存在着大量不同种类的蛋白质分子,这些细胞表面分子在T、B细胞及其亚群之间并不完全相同,可依据它们鉴定T、B细胞及其亚群。这些标志通常分为表面受体和表面抗原两大类。

表面受体是指淋巴细胞表面能与相应配体发生特异性结合的分子结构。T细胞和B细胞均有各自独特的特异性抗原受体,能与相应的抗原发生结合。

表面抗原是指淋巴细胞表面存在的能被特异性抗体(如单克隆抗体)所识别的表面分子。通常这些表面抗原的表达与淋巴细胞分化过程有关,故又称为分化抗原。

表面受体和表面抗原两者之间并无严格界限,它们实际上是细胞表面的膜表面分子。淋巴细胞表面的抗原和受体不仅是鉴定和区别淋巴细胞亚群的表面标志,而且是参与免疫应答过程中细胞相互接触导致激活的重要表面分子。

T细胞表面有多种膜表面分子,这是T细胞识别抗原,与其他免疫细胞相互作用,接受

信号刺激的物质基础，也是鉴别和分离 T、B 细胞亚群的重要依据。

（三）T 细胞亚群

T 细胞是多功能的不均一的细胞群。70 年代以来，随着抗人 T 细胞单克隆抗体研制成功，T 细胞亚群的基础研究得以广泛开展。至今，虽然存在许多功能和分化抗原方面均不相同的亚群，但有关 T 细胞亚群划分的原则和命名尚未统一。目前习惯上先按分化抗原分成两大亚群，而后再根据功能进一步划分。

1．根据 CD 抗原或分化群（cluster of differentiation，CD）划分

根据 CD 抗原或分化群，可将成熟 T 细胞分成 CD4 阳性的 T 细胞和 CD8 阳性的 T 细胞。CD4 阳性细胞群具有辅助性 T 细胞功能；CD8 阳性细胞群具有抑制性 T 细胞和杀伤性或细胞毒性 T 细胞的效应。CD4 和 CD8 抗原分别出现在不同功能亚群的 T 细胞表面，在同一 T 细胞表面只表达其中一种。

所有 T 细胞表面均具有识别和结合特异性抗原的分子结构——T 细胞抗原受体（T cell antigen receptor，TCR），TCR 不能识别和结合单独存在的抗原片段或决定簇。只有当抗原片段或决定簇与抗原提呈细胞上的 MHC 分子结合在一起时，T 细胞的 TCR 才能识别或结合主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex，MHC）。TCR 识别抗原须受 MHC 分子与抗原片段结合的制约。MHC 是指某一物种的某一号染色体上一组密切连锁的基因，它在主要组织相容性抗原识别以及清除外来和内在抗原中起重要作用。人的 MHC 称为 H－LA，小鼠的称为 H－2。MHC 编码的抗原为一类同种异体抗原（alloantigen）。其中Ⅰ、Ⅱ类抗原主要以细胞膜镶嵌蛋白的形式存在，也可脱落成为可溶性形式。它们又称为Ⅰ、Ⅱ类分子。

CD4 和 CD8 抗原可分别与 MHC 的Ⅱ类分子和Ⅰ类分子结合，以促进 TCR 与抗原－MHC 分子复合物的结合。CD4 和 CD8 又分别称为 MHCⅡ类分子受体和Ⅰ类分子受体。

2．根据功能划分

$CD4^+$ T 细胞的亚群：

（1）辅助性 T 细胞（help T cell，T_H），可协助 B 淋巴细胞产生抗体，也能协助其他 T 细胞的分化成熟。

（2）诱导性 T 细胞（inducer T cell，T_I），能诱导 T_H 和 T_S 细胞的成熟。

（3）迟发型超敏反应性 T 细胞（delayed type hypersensitivity T cell，T_D），在免疫应答的效应阶段和Ⅳ型超敏反应中，以释放多种淋巴因子，导致炎症反应发挥排除抗原的作用。

$CD8^+$ T 细胞的亚群：

（1）抑制性 T 细胞（suppressor T cell，T_S），能抑制 B 细胞产生抗体和抑制其他 T 细胞的分化增殖。

（2）细胞毒性或杀伤性 T 细胞（cytotoxic T cell，Tc；killer T cell，Tk），在免疫效应阶段，Tc 识别带有抗原的靶细胞，随后发生细胞接触，接触后再释放穿孔素（perforin）和通过其他机制使靶细胞溶解。

上述 5 个 T 细胞的亚群中，T_H、T_I 和 T_S 相互协调和制约，对免疫应答起调节作用，称为调节性 T 细胞；Tc 和 T_D 在免疫应答的效应阶段发挥作用，称为效应性 T 细胞。

（四）B 细胞亚群

1．B 细胞的表面标志

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

B 细胞的表面标志有：

(1)B 细胞抗原受体：是存在于 B 细胞表面的膜免疫球蛋白(surface membrane immunoglobulin, SmIg 或 mIg)，能识别和结合特异性抗原的受体。SmIg 均为单体结构，在正常人外周血中多数 B 细胞同时携带 SmIgM 和 SmIgD，少数 B 细胞仅携带 SmIgG、SmIgA 或 SmIgE。SmIg 是鉴别 B 细胞的主要特征，常用荧光素标记的抗 Ig 抗体以荧光抗体染色法来检测 B 细胞。

(2)Fc 受体(Fc receptor, FcR)：B 细胞表面存在与 IgFc 段结合的受体。

(3)补体受体(complement receptor, CR)：大多数 B 细胞表面存在能与 C_{3b}和 C_{3d}发生特异性结合的受体，分别称为 CRI 和 CRⅡ。CR 与抗原—抗体－补体复合物结合后也可辅助 B 细胞捕获与 Ig 结合的抗原。

(4)丝裂原受体：B 细胞表面的丝裂原受体与 T 细胞不同。

(5)其他表面受体：B 细胞除有一些与 T 细胞共有的 CD 抗原外，如 CD5，还有一些 B 细胞所特有的 CD 抗原，如 CD9、CD10、CD19 和 CD20。

2.B 细胞亚群的划分

目前仍将 B 细胞分为两个亚群：B_1 细胞和 B_2 细胞。B_1 细胞为 T 细胞非依赖性细胞，接受 Ti 抗原刺激后活化增殖，不需 T 细胞辅助，细胞表面仅有 SmIgM。B_2 细胞为 T 细胞依赖性细胞，与 T_D 抗原结合而发生免疫应答，需 T 细胞辅助，细胞表面同时有 SmIgM 和 SmIgD。

(五)牙髓中的 T、B 细胞和 T 细胞亚群

牙髓作为机体的一部分，自然遵循免疫的普遍规律，然而因其解剖和组织结构的特性不同也表现出一定的个性。

Jontell M, Bergenholtz G(1987)研究证实，正常牙髓中具有与免疫防御系统有关的各种细胞，主要是 T 细胞系，多数分布在牙髓基质中，而且意外发现 CD4/CD8(T_H/T_S)阳性细胞的比值与外周血相反，平均为1:1.6～3.1，正常外周血 CD4/CD8 的比值约大于 1.7。

蜂元等(1988)用同样的研究方法证实了上述结果，并且发现在炎症牙髓中两者的比值逆转，即 CD4 较 CD8 多。

随后，Hahn 等(1989)对人牙髓中 T、B 细胞作了详细的定量研究，结果表明，正常牙髓中 CD4/CD8 为 0.26，可逆性牙髓炎为 0.56，不可逆性牙髓炎是 1.14。还首先在正常牙髓中检测出 B 细胞，否定了曾认为正常牙髓中缺乏 B 细胞的观点。

但是，Mangkornkarn C, Steiner JC, Bohman R 等(1991)采用流式细胞分类术对正常牙髓的 T、B 细胞进行定量分析，其结果与先前的研究明显不同，牙髓细胞中 T 细胞为 1%，CD4/CD8＝1.2:1，未发现 B 细胞，分析认为这种差别可能是流式细胞法能全面精确地对细胞进行计数。

由于免疫细胞化学能在原位确定组织及细胞结构的化学成分或化学性质，因此这种敏感的检测技术已成为当今牙髓中免疫成分研究的主要手段。

吴海珍、文玲英、王泊云(1993)采用免疫细胞化学对正常和炎症人牙髓中的免疫细胞进行了研究，结果表明，正常牙髓中央区有散在分布的 T 细胞和 T 细胞亚群，T 细胞亚群的阳性着色部位在胞膜上，CD4 /CD8 的比值为 0.55。由于 T 细胞在正常牙髓中只是一种常备防御细胞，只有抗原侵入时才触发一系列变化和产生免疫效应，说明这类免疫活性细胞

是在牙髓抵御外界抗原的侵袭中起到提供免疫应答物质基础的作用，其意义可能在于牙髓的免疫保护和免疫监视。正常牙髓中未发现B细胞，提示正常状态下不存在体液免疫应答。

炎症牙髓中T细胞明显增加，并以CD4增加最显著，使CD4与CD8的比值明显增高，平均为1.15，与正常牙髓中的比值相反。CD4主要是T_H亚群，而被激活的T_H又能释放出多种淋巴因子，这些因子是细胞免疫的主要介质，多数以非特异方式作用于细胞，表达多种功能。例如，作用于巨噬细胞(macrophage，MΦ)的因子可以使MΦ大量聚集、激活，并不断吸引血液中的单核细胞和粒细胞移动到局部，构成炎症反应或超敏反应；作用于B细胞的分化因子，能促进B细胞的发展分化，形成浆细胞，产生免疫球蛋白。已经证明：所有发展为产生IgG、IgA和IgE的B细胞均需要T_H在活化过程中的作用。与此同时，T_S受到T_H产生的有关因子作用后，而产生抑制因子调节B细胞的免疫应答。因此，炎症牙髓中CD4明显增加，表明在牙髓炎的免疫应答、炎症性超敏反应和免疫过程中，T_H起着主导作用。

炎症牙髓中有B细胞，且慢性牙髓炎急性发作的组织中的B细胞数量较慢性炎症组织中多，这种现象可能是因为抗原的突然大量入侵或机体免疫应答调节功能的改变，导致B细胞的分化增殖。

B细胞在接受抗原刺激、活化、增殖和分化成浆细胞后，可产生特异性抗体，发挥体液免疫功能。产生抗体的浆细胞是含免疫球蛋白细胞，称为抗体产生细胞。研究证实：正常牙髓缺乏抗体产生细胞，炎症牙髓中有明显增多的抗体产生细胞，IgG、IgA、IgM细胞之间的比例均为23:7:1，说明炎症牙髓中存在体液免疫反应。抗体的产生可以保护牙髓，但若牙髓受到抗原的过量刺激，相继形成大量免疫复合物不能完全被吞噬或清除，则可使局部组织出现以血管变化、炎细胞浸润、组织损伤为特征的Arthus反应，引起牙髓的严重损害。B细胞也具有抗原提呈能力，能提呈某些抗原决定簇给T细胞引起免疫反应，因此，免疫反应可作为牙髓防御的机制和组织损害的介导。

四、单核吞噬细胞和树突状细胞

在免疫应答过程中，除T细胞和B细胞起核心作用外，尚需一些免疫细胞包括单核吞噬细胞和树突状细胞协助参加，这些细胞为辅佐细胞，简称A细胞。因A细胞在免疫应答中的主要作用之一为提呈抗原，故又称为抗原提呈细胞(antigen presenting cell，APC)或Ia抗原表达细胞。抗原提呈细胞可以吸收和处理复杂的抗原，并以适当的形式将抗原提呈给淋巴细胞，即当机体受到外来抗原侵袭时，APC上的Ia抗原与外来抗原形成复合物，并提呈给辅助T淋巴细胞(T_H)，只有具有此种复合物受体，能同时识别外来抗原和Ia抗原的T细胞才能活化，从而启动体内的免疫应答。Ia抗原提呈细胞有巨噬细胞、树突状细胞、B细胞、活化的T细胞、中性粒细胞和郎罕氏细胞等，其中最主要的是单核吞噬细胞和树突状细胞。

(一)单核吞噬细胞

单核吞噬细胞系统(mononuclear phagecyte system)是血液中的单核细胞(monocyte)和组织中的巨噬细胞(macrophage，MΦ)的统称。单核细胞在骨髓分化成熟进入血液，在血液中停留数小时至数日后，通过毛细血管进入组织中，分布在全身多种器官和结缔组织中分化成熟为巨噬细胞。巨噬细胞在正常组织中一般是静止的，在结缔组织中又被称为组织细胞。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

1.单核吞噬细胞的表面受体

单核吞噬细胞表面有多种受体。与免疫有关的重要受体有 C3b 受体,以及某些淋巴因子受体,MΦ 表面有较多的 MHC Ⅰ类和Ⅱ类分子,与抗原提呈有关。它具有多种功能,是维持机体正常防御和生理平衡必不可少的细胞。

2.单核吞噬细胞的免疫学功能

单核吞噬细胞具有多种免疫学功能,既参与非特异性免疫应答,也参与特异性免疫应答。主要功能有:

(1)吞噬和杀伤作用。

组织中的巨噬细胞可吞噬和杀灭多种病原微生物和处理衰老损伤的细胞,是机体非特异性免疫的重要因素,与抗体(IgG)和补体(C3b)结合的细菌等抗原物质,更易被 MΦ 吞噬,这就是抗体和补体的调理作用。MΦ 还可通过 Fc 受体与结合有 IgG 抗体的靶细胞发生结合,发挥 ADCC 作用,杀伤靶细胞。淋巴因子可激活 MΦ,使其更有效地杀伤细胞内寄生菌和杀伤肿瘤细胞。

(2)抗原提呈作用。

在免疫应答中,MΦ 可摄取、处理抗原,并将有效抗原成分提呈给淋巴细胞。MΦ 处理抗原的过程尚不十分清楚,目前认为经适当降解的抗原与 MΦ 主要组织相容性复合体(MHC)的Ⅱ类抗原,即小鼠 Ia 抗原或 LHLA - DR 抗原在 MΦ 表面形成 MHC - 抗原复合物,再向具有此种复合体受体的 T 细胞提呈。MΦ 是重要的抗原提呈细胞(APC)。

(3)合成和分泌作用。

MΦ 为高度的分泌细胞,已知 MΦ 能合成和分泌的生物活性物质至少有 50 种以上,通过分泌各种生物活性物质参与免疫应答、炎症过程和组织修复。有人将 MΦ 分泌的生物活性物质称为单核因子(monokine),而将能调节淋巴细胞活性的物质称为淋巴细胞活化因子(lymphocyte activating factor, LAF)。淋巴因子或抗原抗体复合物激活的 MΦ 还通过产生蛋白分解酶,生成活性氧,释放花生四烯酸代谢产物,从而引起组织损伤和参与炎症反应。

(4)抑制作用。

即当 MΦ 过多存在时,抑制性 MΦ(supressor macrophage, SMΦ)对免疫反应起抑制作用,它能抑制抗体的产生、淋巴细胞母细胞化、淋巴细胞混合培养反应和细胞杀伤反应等,具体机制尚不明确。

并不是所有的 MΦ 都具这些功能,不仅不同组织中 MΦ 功能不一样,即使是同种组织中的 MΦ 也不相同。因此,MΦ 在功能上为一个非均一性的集团。

MΦ 必须先被活化,然后才能行使其功能。它在体内活化的因素有:T 细胞活化产物;免疫复合物;补体活化裂解的产物 C3b。

MΦ 有多种功能,主要可归结为两个方面,一是提呈抗原作用,摄取、处理和传递抗原给淋巴细胞;二是释放细胞因子,促使接受抗原的淋巴细胞活化和增殖,即提呈抗原和通过细胞因子激活淋巴细胞。

(二)树突状细胞

树突状细胞(dendritic cell, DC),简称 D 细胞,来源于骨髓,由髓样干细胞分化而来,随血流进入组织,分布在各处的淋巴器官和组织中。D 细胞的特点是细胞表面伸出许多树突状突起,胞内线粒体丰富,高尔基体发达,但无溶酶体及吞噬体,故 D 细胞无吞噬能力。大

多数 D 细胞有较多的 MHC Ⅰ类和Ⅱ类分子，这与 D 细胞有较强的抗原提呈能力有关。少数 D 细胞表面有 Fc 受体和 C3b 受体，可通过结合抗原－抗体复合物将抗原提呈给淋巴细胞。

巨噬细胞与树突状细胞处理抗原的能力有所不同，前者的吞噬能力较强，抗原提呈能力较弱；后者是提呈抗原的主要细胞，而很少或没有吞噬能力，也许树突状细胞与巨噬细胞分别提呈不同的抗原。

（三）牙髓中的 Ia 抗原表达细胞

单核吞噬细胞和树突状细胞同属于 Ia 抗原提呈细胞或 Ia 抗原表达细胞。Ia 抗原表达细胞不仅分布在机体免疫系统组织内，而且也广泛存在于全身非免疫系统组织中。实验研究证实，正常人、大鼠牙髓中有一定量的 Ia 抗原表达细胞。根据形态学将牙髓中 Ia 抗原阳性细胞分为 MΦ 和 DC。有人指出，部分单核巨噬细胞也表现为树突状形态，而且在用单核、巨噬细胞单抗的研究中也发现有相当数量的巨噬细胞呈树突状外观，因此不能肯定树突状的阳性细胞都是树突状细胞。目前认为牙髓中的 Ia 抗原表达细胞有两种，一种是 MΦ 样细胞，另一种为树突状细胞样细胞。Jontell M，Bergenholtz G(1987)将牙髓中的 Ia 阳性细胞按形态分为两类：一类为位于成牙本质细胞层，呈树突状的树突状细胞样细胞；另一类分布在牙髓中央结缔组织内，体积较大，呈圆形或椭圆形的 MΦ 样细胞。在诱导 T 细胞增生的功能研究中发现树突状细胞起主要作用，具有提呈抗原给 T 淋巴细胞的作用，而巨噬细胞缺乏这种能力，树突状细胞在牙髓免疫防御中起着必不可少的作用。虽然牙髓树突状细胞不能识别外来抗原，但可以提供必要的信号，激活 T 淋巴细胞产生免疫反应，参与牙髓的防御过程。Okiji T，Kawashima N，Kosaka T 等(1992)采用 Ia 抗原和 MΦ 特异性抗体双重染色，对牙髓中的 Ia 抗原阳性细胞进行分类，结果认为 Ia 抗原阳性细胞由 Ia 抗原阳性渗出性 MΦ、树突状细胞和 Ia 抗原阳性的 MΦ 组成。大鼠牙髓中的 MΦ 按 Ia 抗原表达能力可分为两类，即 Ia^+ 和 Ia^- 的 MΦ。

吴海珍、文玲英、王治云(1992)研究表明，正常人年轻恒牙牙髓中有较多的 Ia 阳性细胞，主要位于成牙本质细胞层和血管周围。在龋源性炎症牙髓中 Ia 阳性细胞明显增多。同时发现，Ia 抗原的表达部位多在细胞膜上，少数位于胞浆内。阳性细胞形态多数为有细胞突起的不规则形、椭圆形、圆形和条索状。炎症牙髓中的阳性细胞则以椭圆形为主，部分细胞呈典型的树突状。

Bergenholtz G，Nagaokas，Jontell M(1991)用 LPS、ConA 分别封入大鼠切牙牙髓激发牙髓炎症，结果也出现了 Ia 阳性细胞不断增多的现象。认为 Ia 阳性细胞在损害组织中的出现与释放抗原物质有关。

侯本祥(1996)用 5mg/mL 的大肠杆菌内毒素溶液涂布大鼠磨牙穿髓点 30 min，建立了内毒素性牙髓炎模型，通过免疫组化手段，观察内毒素刺激的炎症牙髓中 MΦ、Ia 抗原表达细胞的动态变化。结果，LPS 刺激牙髓后 1d，MΦ、Ia 抗原表达细胞向穿髓点下方移行、浸润，组织细胞体积增大。3d 时这些细胞向炎症区聚集，数量明显增加。说明在 LPS 入侵早期，组织细胞较早感知抗原刺激，将牙髓的防御机能从静止状态活化，调动 Ia 抗原表达细胞和来自血中的 MΦ 向炎症区移行，共同参与清除外来抗原的防御反应。

Ia 抗原表达细胞作为抗原提呈细胞，具有在 T 细胞认识非已抗原的过程中，将抗原物质进行适当修饰后提呈给 T 细胞受体的功能。T 细胞必须同时识别提呈的抗原及提呈细

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

胞表面的 Ia 抗原方能活化。实验表明:在 LPS 刺激后 3d,Ia 抗原表达细胞即增加并达到高峰,聚集在炎症区周围。提示这些细胞可能具有向 T 细胞提呈抗原的能力,它们将外来抗原提呈给特异性 T 淋巴细胞,启动细胞免疫应答,出现抗原特异性防御反应。

可以认为正常牙髓中的 Ia 阳性细胞是一种常备的免疫防御细胞,起清除和免疫监视作用,当外界物质侵入牙髓后,这些细胞群便对抗原物质进行处理和加工,并将抗原决定簇提呈给特异性 T 细胞启动免疫反应,发挥免疫应答和炎症反应的多重效应。

五、血管内皮细胞

内皮细胞(endothelial cell, EC)是位于血管内膜表面的细胞。以往认为:EC 具有覆盖血管内腔和隔离血液与机体内环境的屏障作用,近期的研究表明,内皮细胞层是一个代谢活跃的组织,是体内最大的代谢与内分泌器官。因 EC 处于血管内膜表面,与血液循环中的免疫细胞有广泛的接触机会,外界微生物进入机体时可能先经过 EC 作用,然后在局部或全身发生免疫反应,因此说大量的血管内膜是一个很大的免疫反应场所。

人体内大约有 1 012 个血管内皮细胞,总重量 1 000 ~ 1 500 克,与肝脏重量相当,面积约 1 000 m^2, 是自身体表面积的 500 ~ 700 倍。目前 EC 已成为医学生物学领域中重要的研究对象。

EC 是体内极其重要和活跃的炎症细胞,它在炎症反应中的作用有:

(一)调节血管通透性

EC 间的紧密连接能有效地防止血管中各种血液成分的漏出。20 世纪 60 年代末,Majno 首先注意到组胺类炎症介质引起的血管壁通透性增高主要不是因 EC 受损伤,而是 EC 收缩,细胞连接间隙增大所致。提示 EC 是通过收缩而影响细胞连接和血管壁通透性的。机体的血管内皮细胞为扁平状,衬覆于血管内表面,离体培养的 EC 为单层致密连接的上皮样细胞,细胞间连接紧密,没有重叠、伪足和突起。多种炎症介质,如血小板激活因子(PAF)、肿瘤坏死因子(TNF)、白介素 - 1(IL - 1)、干扰素 - γ(IFN - γ)等都能不同程度地刺激 EC,使细胞变长,呈纤维母细胞样,并伸出树枝状细胞突起,紧密接触的细胞连接出现裂隙。Montesano R, Orci L, Vassalli P(1985)报道,IFN - γ 和 IL - 1 联合应用处理 EC,可使细胞极度伸长,呈现游走细胞的特征。Stolpen AH, Guinan EC, Fiers W 等(1986)报道,用 IFN - γ 和 TNF 处理 EC 也出现类似的效果。表明一些细胞因子可通过协同作用引起 EC 形态变化。机体微血管 EC 受刺激后胞体回缩,细胞间隙增大,这可能是炎性介质和免疫活性因子引起血管通透性增高的重要机制之一。实验证明:狒狒皮内注射入重组 TNF,可导致血管通透性上升,局部组织水肿和大量炎细胞浸润。根据这个原理,临床上可以通过阻断炎症介质对 EC 的作用防止细胞回缩,达到拮抗血管通透性增高的目的。

EC 形态变化的机制尚不完全清楚,可能主要与细胞骨架成分的分布状态、功能变化以及细胞外基质丢失有关。实验表明:EC 与 TNF 接触后,出现细胞骨架改变和细胞内沟形成,同时 EC 层下呈致密网状排列的纤维黏连蛋白丢失,呈现"虫蚀状"斑片。纤维黏连蛋白的变化和细胞骨架的改变同细胞形态的变化相平行。

(二)调节血液凝固功能

EC 能产生很多与凝血、抗凝血有关的物质。正常分泌的 PGI - 2、硫酸肝素样物质、血栓调节蛋白和溶酶原激活物等可产生很强的抗凝作用。相反,PAF、纤溶酶原酶激活物的抑

制则可促进凝血过程。生理情况下，EC 表面的凝血 - 抗凝血平衡稍偏向抗凝血一侧。当 EC 受到损伤或受到 TNF、IL - 1 等刺激后，EC 分泌的与凝血有关的因子明显增多，使正常的抗凝特性迅速转为促凝特性，血管内易发生凝血。体内实验表明，给兔血管内注射 IL - 1，凝血机制活化和纤维黏连蛋白沉积。这种反应本是机体的保护措施，有利于止血，若反应过度，便会促进微循环障碍和炎症等病理过程。

（三）调节血管舒缩功能

EC 对局部和全身的血管张力都有很重要的调节作用。EC 释放的血管舒张因子有 PGI - 2、内皮细胞源血管舒张因子（EDRF）。PGI - 2 有抑制血小板聚集、扩张血管、促进纤溶、保护细胞等作用，还可以影响细胞的通透性和收缩性。EDRF 为 EC 受乙酰胆碱、缓激肽、组胺、5 - 羟色胺刺激后产生，主要作用有舒张下层平滑肌及抑制血小板聚集和黏附。抑制 EDRF 作用的物质有美蓝、血蛋白、肌红蛋白和过氧化物阴离子还原剂。EC 产生的血管收缩因子主要有 TXA2、血管紧张素 - Ⅱ、氧自由基和内皮素（ET），ET 是迄今所知的最强的缩血管物质。给大鼠静脉注射 ET - 1 可引起升压反应，缺氧、凝血酶、肾上腺素等可刺激 EC 迅速合成 ET。EC 产生的血管舒张因子与收缩因子的比率决定血管的舒缩状态，调节器官血流量。

（四）EC 与白细胞的相互作用

EC 与白细胞黏附是白细胞趋化、游走和吞噬活动的基础。在炎症反应开始时即可出现白细胞与 EC 的黏附，表明它们的黏附在炎症过程中起主要作用。EC 对白细胞的黏附是白细胞游走到组织间隙发挥作用的前提，它们的黏附主要与黏附分子有关。

已经证实，EC 表达多种黏附分子，主要有：

ICAM - 1 是白细胞表面黏附分子 CD11 - CD18 系统的配体，分子量 84 ~ 95 kDa，参与淋巴细胞、单核细胞、多形核白细胞与 EC 的黏附。IL - 1、TNF 能显著增加 EC 表面 ICAM - 1 的表达，24 h 达高峰，如果炎症介质持续存在，ICAM - 1 表达持续增加。ICAM - 1 可能与慢性炎症过程密切相关。

VCAM - 1 分子量为 110 kDa，介导淋巴细胞、单核细胞黏附于 EC。IL - 1、TNF、LPS 可迅速诱导 EC 表达 VCAM - 1，促进淋巴细胞游出血管和聚集在组织内。

ELAM - 1 分子量 115 kDa，可促进中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞黏附于 EC。IL - 1、IFN 可诱导 ELAM - 1 表达，4 ~ 6 h 达高峰，24 h 下降。在炎症反应早期引起白细胞贴壁。TNF - γ 不能诱导 ELAM - 1 表达，但能增强并延长 ELAM - 1 表达。IFN - γ 只能使 EC 与 T 细胞黏附增强，而不能增强与其他白细胞的黏附。

GMP - 140 又称 P - 选择素。最近发现：白细胞只有在与 GMP - 140 作用并发生滚动，流速减慢的情况下，才能黏附于 EC。这说明 GMP - 140 在白细胞黏附的启始阶段极为重要。

EC 通过表达各种黏附分子促使白细胞与其黏附，这样就决定了白细胞聚集在局部炎症的病灶内。

（五）分泌炎症介质、生成细胞保护剂

EC 不仅是细胞因子作用的靶细胞，而且它还可以分泌多种介质调节炎症细胞的功能。EC 可表达和分泌集落刺激因子（CSFs）；IL - 1、TNF 可以诱导 EC 对 CSFs 基因的转录；病毒可诱导 EC 生成 IFN - α、β；TNF、IFN - γ 等多种因子可诱导 EC 表达和分泌 IL - 1；EC 可合

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

成大量 IL－6,而 IL－1、TNF 等可增强 EC 对 IL－6 的合成;这样 EC 形成的炎症介质就形成一个相互促进的循环,在炎症组织的病理生理中起着重要作用。因此,EC 被认为是体内极其重要的活跃的炎症细胞。与此同时,EC 还合成分泌多种拮抗炎症介质作用的物质,作为调节炎症反应的负反馈信号,以减轻炎症对机体的损害。EC 可生成多种细胞保护剂。

(六)EC 的免疫功能

主要组织相容性复合体(MHC)是控制免疫应答和疾病易感性的基因群,其编码物质是组织相容性抗原。其中Ⅰ、Ⅱ类抗原在组织移植、免疫监视、免疫遗传过程中有重要地位。Ⅱ类抗原主要参与免疫调节,直接约束 T_H 对抗原的识别。可溶性抗原不能直接激活 T_H,必须先由具有相同的 MHC－Ⅱ类抗原的抗原提呈细胞处理后再提交给 T 细胞,才能引起 T 细胞增殖与分化。

人、猴体内 EC 为 MHC－Ⅱ类抗原阳性。体外培养的 EC 经 IFN－γ 刺激后,MHC－Ⅱ类分子 mRNA 水平升高。

细胞表面表达 MHC－Ⅱ分子。TNF、IFN－α、β 抑制 IFN－γ 对 MHC－Ⅱ类抗原的诱导作用,然而,IFN－ γ 一旦完成了诱导,其他因子就不能使 MHC－Ⅱ的表达下降。EC 表达 MHC－Ⅱ类抗原,说明它是一种抗原提呈细胞。EC 还可刺激 T 细胞活化。培养的人 EC 可使 $CD4^+$ T 细胞生成的 IL－2 增加 3～10 倍,而且这种促进作用不是通过 IL－1、6 或生成的其他因子实现的。说明 EC 可导致 T 细胞活化和分泌效应分子, EC 在细胞介导的免疫反应中的作用是重要的。

总之,内皮细胞层是一个代谢活跃的组织,它不仅可以调节血管通透性、血管张力和凝血功能,而且是体内最大的代谢和内分泌器官,可以表达多种抗原成分,分泌多种生物活性因子,在炎症、免疫和修复反应中发挥重要作用。

已经证实:正常牙髓中部分 EC 可以表达 MHC－Ⅱ类抗原,炎症牙髓中,MHC－Ⅱ类抗原阳性 EC 明显增多,说明在牙髓炎症中,EC 作为一种抗原提呈细胞积极参与局部免疫应答。内毒素性牙髓炎中,EC 可分泌 IL－1β、IL－6、IL－8、TNF－α 等多种细胞因子,参与炎症反应。吴海珍、文玲英(1993)曾报道,炎症牙髓中,EC 所特有的标志物 vWF(von willebrond factor, vWF)含量显著升高,认为该因子在牙髓的自身稳定和修复方面发挥积极作用。原位杂交发现,正常、炎症牙髓组织中的 EC 均有 BMP3 mRNA 表达,而 BMP3 可促进牙髓细胞的分化与增殖,并诱导牙本质桥的早期形成。推测 EC 参与了牙髓细胞的诱导分化过程。实验显示,炎症牙髓和损伤修复过程的牙髓中 EC 可合成分泌大量的 TGF－β、EGF、TNF－α 等细胞因子,无疑进一步证明了 EC 是一种具有多种生物学功能的细胞,它通过合成多种活性物质参与了牙髓的炎症和修复反应,在牙髓自身防御中起了不可忽视的作用。

EC 生成的活性介质可以通过多种途径发挥作用。自分泌作用:活性因子作用于 EC 自身,不仅影响其生长、增殖和分化,而且可以调节其分泌活性,并影响其他介质的功能。旁分泌作用:影响邻近的牙髓细胞、炎症细胞的生物学行为。另外,由于 EC 始终与血液相接触,它分泌的活性介质可随血流达到牙髓的各个部位,产生更为广泛的影响。所以 EC 是牙髓组织中重要的炎症细胞和修复细胞。

六、肥大细胞

肥大细胞(mast cell, MC)是 1877 年 Erlich 首先命名和描述的细胞,它存在于机体许多

器官中，是疏松结缔组织中的一种细胞成分，为圆形或椭圆形、胞质充满紫红色颗粒的细胞。当机体受到刺激时，或肥大细胞受到损伤及激发后，则可大量增加并脱颗粒，释放组胺、慢反应物、肝素和5－羟色胺，以及前列腺素、激肽、细胞因子等，从而参与机体广泛的生理功能和免疫反应。

近年来，随着分子生物学的研究进展，获得了许多有关肥大细胞的分子生物学及其生物学效应资料。

肥大细胞(MC)不仅在速发型变态反应中起重要作用，而且参与迟发型反应(later phase reactions, LPRs)。近年研究发现：MC还具有多种细胞因子的特性，并通过肥大细胞和白细胞分泌的细胞因子级联反应(cascade)介入机体的多种生理、病理过程。

(一)肥大细胞的分子生物学

MC的分子生物学研究取得了很大进展，一是发现了新的表面受体，并从分子水平上对MC表面受体介导效应有了进一步认识；二是克隆了多种肥大细胞蛋白酶(mast cell protease, MCP)的基因。

现已发现MC的表面结构由细胞黏附分子和表面受体组成。

肥大细胞含有四种糜蛋白酶、两种类胰蛋白酶、一种肽链端解酶即羧肽酶A。

(二)肥大细胞的生物学效应

MC通过释放脂源性介质、分泌颗粒介质和细胞因子等发挥其影响机体内多种生物反应过程的作用包括：

1.淋巴细胞反应，如黏附、趋化、IgE生成、MC增殖和嗜酸性粒细胞激活；

2.纤维母细胞反应，如增殖、空泡形成和胶原生成；

3.酶底物反应，如Ⅳ型胶原和脂蛋白等的降解，凝血反应系统的激活；

4.微血管反应，如微静脉通透性增加，淋巴细胞黏附及微血管收缩或扩张。

MC是多种细胞因子的产生细胞，产生的细胞因子有IL－1～IL－6、GM－CSF、IFN－γ、TNF－α、TNF－β等。

调节MC产生细胞因子的途径有两种：一是免疫激活途径，二是TPA样物质刺激途径。前一种途径除快速诱导炎症因子的合成以发挥MC对血管内皮细胞、淋巴细胞和凝血系统的效应外，还导致多种免疫调节因子或造血生长因子的释放，而后一种途径则可能偏向诱导MC释放炎症介质。

近年研究还发现，TNF－α代表着MC的一种新介质类型，与目前已知的MC介质如组胺类或脂源性介质不同，TNF－α的分泌既有来自胞内预先合成的，亦有经刺激后新合成的。但是，目前对MC分泌的TNF－α和MΦ分泌的TNF－α是否为同一物质尚未确定。

迟发型反应(LDRs)是引起组织损伤、哮喘病和IgE依赖性慢性炎症反应的主要原因，其发生机制与MC及其释放的介质密切相关。有实验研究发现，LPRs的发生具有MC依赖性，并且在MC重建位点有TNF－αmRNA的高表达和大量的中性粒细胞浸润；当以抗TNF－α抗体进行阻断时则出现细胞肿胀减轻，中性粒细胞浸润减少50%的现象。提示通过干扰或阻断MC产生细胞因子的途径对治疗LPRs可能有一定临床意义。

(三)人牙髓组织中的肥大细胞

关于人正常牙髓组织中是否存在肥大细胞尚有争论。

Wislocki等研究了鼠、猴、人牙髓组织，仅在猴牙髓组织中某个时期发现“可靠的肥大细

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

胞”。而且,他们在研究不同哺乳动物的组织时发现牙龈组织中有大量肥大细胞,而牙髓组织则完全缺乏。Annerath 等在研究 18 例人牙髓和牙龈时也得出同样的结论。

Dochrill 在人活检和尸检材料研究中发现,除肿胀的牙髓含有肥大细胞外,正常牙髓组织中缺乏肥大细胞。因而过去人们认为牙髓组织仅是机体缺乏肥大细胞的结缔组织。

文玲英、马福成(1989)观察了 10 例正常牙髓组织,发现有少数散在的肥大细胞,每例牙髓标本的 MC 约有 2~3 个,表明正常牙髓组织中的肥大细胞数少而不是没有。鉴于牙髓组织的特殊环境和增龄变化,人牙髓中肥大细胞的存在可能与牙髓组织的某个时期有关。

目前已知,肥大细胞并非起源于未分化间充质细胞,而是起源于造血干细胞,也有它的细胞亚群。

Miller 认为大鼠的肥大细胞系至少有两个亚群:结缔组织肥大细胞和肠黏膜肥大细胞,它们之间有许多相同特征,但各有其特点。

Berrett 报道:不同动物,不同组织中肥大细胞有功能异质性(heterogeneity),推测牙髓中的 MC 可能是肥大细胞系中的某个亚群,它与其他结缔组织、肠黏膜中的 MC 不完全相同,也有它特有的“功能异质性”。

炎症牙髓组织中,肥大细胞数较为增多,平均每例标本的 MC 数约为 5~7 个,多分布于小血管的周围。虽然正常和炎症牙髓中肥大细胞的作用和功能至今仍不清楚,然而,肥大细胞的生物学效应在正常和炎症牙髓中同样具有重要意义。

七、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞

(一)中性粒细胞

由于中性粒细胞活泼的吞噬功能,主要作为效应细胞,在非特异性抗感染免疫中,以及抗体介导的超敏反应中起重要作用。

中性粒细胞之所以与免疫系统有着重要的联系,首先是因为它们有趋化性。由活化的淋巴细胞所释放的中性粒细胞趋化因子(NCF),能引导中性粒细胞到免疫反应的部位。其次,中性粒细胞也具有 C3b 和抗体 Fc 区的膜受体,能与抗原 - 抗体复合物上游离出的 Fc 部分结合,从而形成了中性粒细胞 - 抗体 - 抗原复合物,增强了对抗原的吞噬作用,而且,活化的中性粒细胞还可通过释放的多种细胞因子参与免疫应答。

(二)嗜酸性粒细胞

嗜酸性粒细胞也具有吞噬作用,对抗原 - 抗体复合物有显著的嗜性。有人曾提到嗜酸性粒细胞很可能就是活化并吞噬了抗原 - 抗体复合物的一种细胞,它也同样具有提呈抗原的作用。嗜酸性粒细胞是人类白细胞中唯一能杀死或杀伤寄生虫的细胞。LPS 能刺激中性粒细胞产生趋化因子,在 LPS 诱导的实验性大鼠牙髓炎模型中,观察到中性粒细胞的浸润,表明中性粒细胞在牙髓和尖周病的炎症和免疫病理反应中发挥重要作用。

(文玲英)

第三节 牙髓中的细胞因子

细胞因子(cytokines, CK)是指由多种细胞分泌的,能调节细胞功能的小分子多肽;或指主要由免疫细胞分泌的,在免疫应答、炎症反应和创伤修复中有多种生物学功能的一类低

分子量蛋白质。至今已报告过许多细胞因子，经过深入比较研究发现，有些不同名称的细胞因子实际上是同一物质的不同功能表现，因而有关细胞因子的分类尚未统一。

一、细胞因子的分类和共同特性

（一）根据产生细胞因子的细胞种类进行分类

1. 淋巴因子（lymphokine）。于 20 世纪 60 年代开始命名，主要由淋巴细胞产生，包括 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和 NK 细胞等。重要的淋巴因子有 IL－2、IL－3、IL－4、IL－5、IL－6、IL－9、IL－10、IL－12、IL－13、IL－14、IFN－γ、TNF－β、GM－CSF 和神经白细胞素等。

2. 单核因子（monokine）。主要由单核细胞和巨噬细胞产生，如 IL－1、IL－8、TNF－α、G－CSF 和 M－CSF 等。

3. 非淋巴细胞、非单核巨噬细胞产生的细胞因子。主要由骨髓和胸腺中的基质细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞等细胞产生，如 EPO、IL－7、IL－11、CSF、内皮细胞源性 IL－8 和 INF－β 等。

（二）根据细胞因子的主要功能分类

1. 白细胞介素（interleukin, IL）。1979 年开始命名，由淋巴细胞、单核细胞或其他非单个核细胞产生的细胞因子，在细胞间相互作用、免疫调节、造血以及炎症过程中起重要调节作用，目前凡命名的白细胞介素的 cDNA 基因克隆和表达均已成功，现已报道 IL－1～IL－15。

2. 集落刺激因子（colony stimulating factor, CSF）。根据不同细胞因子刺激造血干细胞或分化不同阶段造的血细胞在半固体培养基中形成不同的细胞集落，分别命名为 G－CSF、M－CSF、GM－CSF 等，不同的 CSF 不仅可刺激不同发育阶段造血干细胞的增殖和分化，还可促进成熟细胞的功能。

3. 干扰素（interferon, IFN）。1957 年发现的细胞因子，最初的发现是某一种病毒感染的细胞能产生一种物质干扰另一种病毒的感染和复制而得此名称。根据干扰素产生的来源和结构不同，可分为 IFN－α、IFN－β 和 IFN－γ，它们分别由白细胞、成纤维细胞和活化 T 细胞所产生。各种不同的 IFN 生物学活性基本相同，具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等作用。

4. 肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor, TNF）。最初发现这种物质能造成肿瘤组织坏死而得此名称。根据其产生来源和结构不同分为 TNF－α、TNF－β 两类，前者由单核－巨噬细胞产生，后者由活化 T 细胞产生，又称为淋巴毒素（lymphotoxin, LT）。两类 TNF 的生物学活性基本相似，除具有杀伤肿瘤细胞外，还有免疫调节，参与发热和炎症发生等。

5. 与创伤愈合关系密切的生长因子。

（1）表皮生长因子（epidermal growth factor, EGF）。1959 年由 Cohen 在继神经生长因子（NGF）研究之后偶然发现。1962 年，Cohen 分离出这种因子。1972 年，Cohen 等弄清了 EGF 是由 53 个氨基酸残基组成的多肽，后来又搞清了其一、二、三级结构。EGF 具有促上皮细胞和中胚层细胞分裂增殖，促皮肤和牙齿成熟，抑制胃酸分泌，促胎盘分泌人绒毛膜，促性腺激素，对上皮细胞、内皮细胞、单核细胞有趋化迁移，以及促成纤维细胞合成或分泌胶原酶等作用。

（2）血小板衍生生长因子（platelet－derived growth factor, PDGF）。1970 年由 Balk、Ross 和 Kohler 发现和分别证实，是一种在凝血过程中从血小板释放，在创伤过程中起重要作用的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

细胞因子。PDGF可促进成纤维细胞、平滑肌细胞和神经胶质细胞增殖,对中性粒细胞、单核细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞有趋化迁移作用,可促进成纤维细胞合成或分泌胶原酶,促进中性粒细胞合成或分泌溶菌酶和中心蛋白酶。

(3)成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)。1974年,Gospodarowicz D, Moran J报告从牛脑垂体中发现一种对BALB-C 3T3细胞等成纤维细胞促进生长的物质而命名。可促进中胚层和神经外胚层源细胞分裂,诱导新生血管形成,对神经元有营养作用,对内皮细胞和成纤维细胞有趋化性迁移作用,可促进内皮细胞合成或分泌纤溶酶活化剂、胶原酶、胶原和纤维结合素,促进成纤维细胞合成或分泌胶原酶和胶原等。

(4)转化生长因子(transforming growth factor, TGF)。1978年,de Larco JE和Todaro GJ在小鼠肉瘤病毒转化细胞株的条件培养基中鉴定出一种新的活性多肽,这种多肽能与^{125}I-EGF竞争同一受体,刺激正常指示细胞(NRK)发生表型转化,命名为TGF。后来对其充分纯化后才发现,TGF实际上是TGF-α与TGF-β两种物质的混合物。而TGF-β无论分子组成、膜受体结构,还是诱发的生物学效应,都与TGF-α截然不同,是体内存在的一种极其广泛的调节物质。TGF-β可促进成纤维细胞、成骨细胞、胶原细胞的分裂增殖,抑制内皮细胞增殖,增加单核细胞和成纤维细胞的趋化性,促进成纤维细胞合成或分泌纤维结合素、胶原、胶原酶、蛋白酶抑制剂、透明质酸和氨基酸等。

(5)胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)。是一族既有胰岛素样合成代谢作用又有生长促进作用的多肽。据不完全统计,生物体内能合成与分泌IGF的细胞有18种之多,人血浆中主要有IGFⅠ与IGFⅡ两种,前者为一种生长激素依赖性的碱性蛋白,后者为一种中性单链多肽。促进骨细胞、软骨细胞、肾细胞、平滑肌细胞和某些上皮细胞的分裂增殖,促进成纤维细胞合成或分泌胶原。

(6)神经生长因子(nerve growth factor, NGF)。NGF是最早发现的生长因子,可促进神经元的分化、发育,促进B细胞和肥大细胞的分裂增殖,对中性粒细胞、单核细胞和成纤维细胞具有趋化迁移作用。

(三)细胞因子的共同特性

1. 均为低分子量的分泌性蛋白质分子,绝大多数为糖蛋白,分子量在15~45 kDa。

2. 主要在局部以旁分泌(paracrine)或自分泌(autocrine)的形式产生。通常以旁分泌和自分泌形式作用于附近细胞和细胞本身。在生理状态下,绝大多数细胞因子只在产生的局部发挥作用。

3. 分布广,几乎存在于所有类型的组织中。一种细胞因子可来源于不同类型的细胞,还可对不同类型的细胞起作用。

4. 具有高效能作用。一般在pmol/L(10^{-12}M)水平即有明显的生物学效应。

5. 细胞因子的生物学效应与细胞表面的受体结合、亲和力大小有关。细胞反应的强度决定该因子的局部浓度、细胞类型及其他因子的影响。不同细胞因子常常具有某些相同的生物学活性 。

6. 细胞因子对细胞增殖、分化的调控作用取决于细胞所处的特定环境和功能状态,可表现为促进或抑制等多重调节作用(multiple regulatory action)。细胞增殖与分化功能的维持需要多种细胞因子协同或逐级发生作用。

7. 正常的静息状态的细胞需经激活后才能合成和分泌细胞因子,细胞因子平时极少

贮存。经适当刺激可迅速合成并释放，刺激停止后很快终止合成并降解。

（四）细胞因子网络（cytokine network）作用

1.一种细胞因子可诱导或抑制另一种细胞因子的产生和作用，如 IL-1 和 TGF-β 分别促进或抑制 T 细胞 IL-2 的产生。

2. 一种细胞因子可诱导或抑制另一种细胞因子受体的表达，也可调节本身受体的表达。如 TGF-β 可降低 T 细胞 IL-2 受体的数量，而 IL-6 和 IFN-γ 可促进 T 细胞 IL-2 受体的表达。

3.一种细胞因子可调节同一种细胞因子受体的表达，如高剂量 IL-2 可诱导 NK 细胞表达高亲和力的 IL-2 受体。

4.细胞因子除了单独具有多种生物学活性外，彼此间还在诱导生成、受体调节及生物学效应等水平上发挥相互作用，构成了一个内容丰富、关系复杂的细胞因子网络。

由此可见，细胞因子作为体内细胞间通讯系统的要素，总是以一定的网络形式参与调控，其效应水平取决于网络系统的整合作用。

由于细胞因子种类繁多，细胞因子间存在协同和制约关系，使其组成的网络极为复杂。细胞因子网络作用的研究已成为免疫学基础和临床免疫学研究的活跃领域。

二、白细胞介素

白细胞介素（interleukin，IL）是一组由活化的单核-巨噬细胞、T 淋巴细胞所分泌的，在免疫调节和炎症反应中发挥作用的因子，目前已正式命名的白细胞介素有 IL-1～IL-15，并已知许多 IL 是来自单核-巨噬细胞和淋巴细胞以外的许多细胞。

（一）白细胞介素-1（IL-1）

IL-1 是单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞等在摄取抗原抗体复合物后，或在抗原提呈过程中产生的，表皮细胞、NK 细胞、B 细胞、成纤维细胞、内皮细胞、脑胶质星状细胞、平滑肌细胞、上皮细胞等在某些条件下亦可产生 IL-1。许多因素可以直接影响单核-巨噬细胞 IL-1 的分泌，例如，在外周血中 20pg/mL 内毒素刺激单核细胞即可产生 IL-1，10ng/mL 内毒素可使单核细胞合成 IL-1 增加 100 倍，而皮质类固醇和前列腺素则对 IL-1 的产生有抑制作用。

人的 IL-1 由不同 cDNA 所控制的 IL-1α 与 IL-1β 组成，分子量约 17.5 kDa，其中 IL-1α 的组成与鼠的 IL-1 的组成具有 62% 的同源性，但与 IL-1β 的同源性仅 26%，尽管如此，α 与 β 型的 IL-1 的生物学活性却很相似。

IL-1 的受体在 T 细胞、成纤维细胞表面为 80 kDa，B 细胞则为 68 kDa，编码这两种受体的基因产物不同，P80IL-IR 称为 IL-1Rt Ⅰ（CDw121a），P68IL-IR 称为 IL-1Rt Ⅱ（CDw121b）。

1. IL-1 的生物学功能

IL-1 的生物学功能是通过与相应高亲和力受体结合而介导的，具有：

(1)促进胸腺细胞、T 细胞的活化、增殖和分化。

(2)促进 B 细胞功能或促进免疫球蛋白的合成和分泌。

(3)刺激骨髓多能干细胞的增殖。

(4)增强 NK 细胞和巨噬细胞产生的 IL-6 和 TNF，并通过单核细胞和巨噬细胞产生的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

IL－8 介导中性粒细胞的趋化作用。

2．IL－1的主要生物学作用

(1)发热作用：IL－1是一种重要的发热因子，是一种内源性热原质(endogenous pyrogen)，炎症所出现的热型与IL－1的生成动态极为一致。极微量纯化的IL－1(约2～3ng/kg体重)即可引起发热现象，但IL－1引起发热的作用与内毒素的不同，IL－1对热敏感，反复注射不产生耐受。

(2)参与免疫反应：IL－1不仅对T淋巴细胞，同时对B淋巴细胞也有作用，它可以诱导B淋巴细胞的分化，但其本质是针对T细胞的。T细胞对抗原或丝裂原的刺激发生增殖反应时需要有MΦ参加，如果体外培养时除去MΦ，则T细胞对刺激物的反应极低，加入IL－1后，反应又大大增加。这一现象说明IL－1对T细胞有促进增殖作用，这种作用是通过IL－1刺激T_H细胞产生IL－2实现的。因IL－1可促进T_H细胞分泌IL－2，故又称为“IL－2释放激素”。

IL－1不仅可诱导T细胞产生IL－2，同时还诱导T细胞产生IL－2受体，它既能诱导产生IL－2，又能加强IL－2对T细胞的反应，所以IL－1是促进免疫功能上升的重要因素。

IL－1对B淋巴细胞的直接作用是促进抗体的产生，而且这种作用又可以由IL－4、IL－5协同而加强。同时，IL－1还可诱导B细胞增殖分泌IL－6，通过这种细胞因子网络对B细胞的功能起着调节作用。

(3)参与炎症反应：炎症早期可以出现发热、外周白细胞增多和游出现象。白细胞向组织内游出，首先必须向血管内皮细胞黏附，IL作用于内皮细胞，诱导细胞表面合成内皮细胞黏附因子，对中性粒细胞和单核细胞的黏附以及游出起主要作用。

IL－1在炎症反应中的作用是复杂的，一是作为一种内分泌激素激发全身与局部的炎症反应，使机体处于应激状态；二是作为旁分泌或自分泌激素对免疫系统内其余细胞或自身细胞起一定调节作用。

(4)抗肿瘤作用：由于IL－1协同IL－2、IFN诱导CTL和NK细胞的杀伤活性，促进杀伤细胞IL－2受体表达以及成纤维细胞分泌IL－6，因而有抗肿瘤作用。

3．牙髓中的IL－1

牙髓中的细胞因子是由D' Souza R，Brown LR，Newland JR等(1989)首先对IL－1开始研究的，他们检测健康牙和龋病、牙周病的牙髓组织匀浆上清液中IL－1的活性，结果表明，有临床症状的龋病牙髓中IL－1的活性明显高于其他组，用抗IL－1单克隆抗体免疫组化证明，产生IL－1的细胞为牙髓基质中的α－奈基乙酸酯阴性MΦ。因为大量的IL－2存在时也能激活上述细胞系的增殖，而不能刺激小鼠NK细胞增殖，所以又应用NK细胞增殖法检测，有症状龋病牙髓中的IL－2并无明显差异。由于IL－1可由微量的抗原刺激而大量产生，有效地诱导机体产生防御反应，以及急性炎症局部的中性粒细胞是IL－1的主要产生细胞，而有症状的龋病牙髓中的MΦ为IL－1阳性细胞，由此说明龋源性牙髓炎大多是慢性炎症的原因，牙髓组织可在龋病抗原的持续作用下，在IL－1的介导下，渐渐出现以防御为主的免疫应答反应。

研究证实：IL－1β等细胞因子与尖周病、牙髓病的病变程度、临床症状密切相关。观察健康和炎症牙髓组织的IL－1β的含量，发现发炎的牙髓成纤维细胞IL－1β的含量是正常牙髓的2.5倍；外源性的IL－1β能刺激正常牙髓成纤维细胞合成胶原，不能刺激患病的牙

髓成纤维细胞形成胶原；IL－1β能抑制体外培养的人牙髓细胞增殖，促进Ⅰ型胶原合成；LPS能诱导体外培养的人牙髓细胞合成IL－1β，IL－1ra可阻断这种作用。提示牙髓疾病与成纤维细胞对IL－1β的免疫反应有关，IL－1β在牙髓、尖周疾病中起重要作用。

（二）白细胞介素－2（IL－2）

IL－2主要由活化的T细胞或T细胞系产生。人IL－2含有133个氨基酸残基，分子量15.5 kDa。

IL－2受体仅存在于活化的T细胞表面，IL－2受体是由α、β和γ三条链组成，大约每个活化T细胞可表达10 000～15 000个IL－2受体。IL－2同T淋巴细胞上的IL－2受体结合导致这些细胞增殖，促进淋巴因子的分泌，提高其他细胞因子膜受体的表达，以及诱导Ⅱ类组织相容性复合体（MHC－Ⅱ）的表达。IL－2还能直接作用于B细胞，促进其增殖、分化和分泌Ig。另外，可活化巨噬细胞。现已发现活化的B细胞也具有IL－2受体，IL－2对B细胞的调节作用除通过刺激T细胞分泌B细胞增殖和分化因子外，还可能有直接调节作用。此外，IL－2同天然杀伤细胞（NK）、LAK细胞及其他细胞毒性细胞的相互作用均可提高其生物学效应，现已开始用于癌症与传染病的免疫治疗。

（三）白细胞介素－3（IL－3）

IL－3刺激骨髓多能干细胞和各类细胞的分化与增殖，故又称多功能集落刺激因子，除具有多功能集落刺激作用外，最近发现IL－3可刺激皮肤上皮细胞、CD4－CD8－TCRαβ细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞的增殖，阻止肥大细胞发生程序性细胞死亡。

（四）白细胞介素－4（IL－4）

IL－4是一种促进B细胞增殖的因子，故又称为B细胞生长因子1（B cell growth factor1，BCGF1），主要由活化T细胞产生，在小鼠由T_{H2}亚群产生。成熟的IL－4分子由120氨基酸残基组成，分子量为14kDa。人与鼠IL－4 DNA水平上有70%同源性。在小鼠、T细胞、B细胞、胸腺细胞、骨髓细胞、巨噬细胞和肥大细胞表面都有IL－4受体。IL－4对B细胞、T细胞、肥大细胞、巨噬细胞等都有免疫调节作用。

（五）白细胞介素－5（IL－5）

IL－5主要由活化T细胞产生，对B细胞、嗜酸性粒细胞、胸腺细胞和T细胞都有作用，其中主要是诱导嗜酸性粒细胞的分化和成熟，与其他的IL相比，IL－5生物学活性作用谱相对较窄。

（六）白细胞介素－6（IL－6）

1. IL－6的产生和受体：IL－6是一种对B细胞、T细胞、浆细胞瘤细胞、肝细胞及其他多种细胞具有作用的多功能的细胞因子。机体中的许多细胞，如T细胞、B细胞、单核－巨噬细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞、上皮细胞等均可产生。它由212个氨基酸残基组成，包括28个氨基酸残基的信号序列，成熟的IL－6为184个氨基酸残基，分子量为26 kDa。IL－6受体（IL－6R）至少由IL－6结合蛋白（IL－6 binding receptor protein）和信号指导蛋白（signal－transducing protein）的gp130组成。IL－6R分布极其广泛，没有严格的靶细胞特异性。活化B_1淋巴细胞、静止T淋巴细胞、骨髓瘤细胞、单核细胞、巨噬细胞、成骨细胞、破骨细胞等的胞膜上均有IL－6R。这也是IL－6具有广泛生物学功能的物质基础。通常情况下，IL－6与IL－6R结合后，使IL－6R的构象发生变化，并迅速与两个gp130分子结合形成高亲和力的结合位点，通过gp130传递信号而使相应基因活化。IL－6通过靶细胞膜表面

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

特异性的 IL－6 受体，而具有多功能的生物学特性。

2. IL－6 的生物学功能

(1)诱导细胞分化：诱导 B 细胞分化并分泌 Ig(IgG、IgA、IgM)，以及诱导 MΦ、神经细胞、NK 细胞、造血干细胞分化。

(2)促进细胞增殖：如 T 细胞、造血干细胞、肾小球系膜细胞、浆细胞瘤细胞和骨髓瘤细胞。

(3)加速肝细胞急性期蛋白(acute phase protein)的合成。

(4)抑制细胞生长：如抑制某些髓样白血病细胞系的生长，促进其成熟和分化，抑制乳腺瘤细胞生长，抑制黑色素瘤等。

(5)参与骨的吸收。

(6)参与炎症反应和脏器移植排斥反应。如细菌、病毒感染的脑膜炎脑脊液中，肺部感染的胸腔积液中 IL－6 水平升高。Cers(1988)报告肾移植术后第二天患者尿和血中 IL－6 水平升高，1 周以后降至正常，如果出现排斥反应，则 IL－6 持续增高。手术后或烧伤后也伴有血清 IL－6 水平升高。目前 IL－6 已作为一个全身炎症性疾病的主要报警信号而越来越被人们重视。

3. 牙髓、尖周组织中的 IL－6：正常牙髓组织渗出液未检出 IL－6，炎症牙髓、尖周组织渗出液均有不同含量的 IL－6，急性炎症高于慢性炎症，急性尖周炎高于急性牙髓炎，慢性牙髓炎与慢性尖周炎无显著性差异。免疫组化染色显示正常牙髓组织无 IL－6 表达，炎症牙髓组织 IL－6 呈阳性染色，主要定位于单核－巨噬细胞、成纤维细胞和少量内皮细胞。IL－6 对人牙髓细胞的生长有一定的抑制作用，并呈时间和剂量的依赖关系，对 ALP 活性无显著影响。IL－6 参与人牙髓细胞胞外基质的降解。IL－1α 或 TNF－α 可诱导人牙髓细胞产生 IL－6，IL－6 的过高表达与牙髓炎的严重程度有关。用龋损处获得的 G^+ 刺激体外培养的人牙髓细胞，可检测到 IL－6 的表达。产黑色素拟杆菌同样也诱导了体外培养的人牙髓细胞产生 IL－6，说明 IL－6 与牙髓炎的发生、发展密切相关。研究还显示 LPS 刺激体外培养的人牙髓细胞表达 IL－6，IL－6 的表达依赖 CD14，抗 CD14 的抗体可以抑制 IL－6 的表达，提示结合免疫调节因子治疗 LPS 引起的牙髓炎也许不失为一种有效的方法。有关 IL－6 与根尖周组织破坏的关系，有文献报道，将外科手术摘除的尖周囊肿进行组织培养，在其培养物中检测到大量高活性的 IL－1、IL－6，免疫细胞化学染色所有标本的 IL－1、IL－6 均为阳性，且主要定位于上皮细胞和少量血管内皮细胞。IL－6 基因敲除(knock－out)小鼠比未敲除小鼠尖周病损发展得快，表明 IL－6 基因遗失促进尖周病损发展。以上研究表明 IL－6 积极地参与了与牙髓、尖周组织炎症的发生和发展。

(七)白细胞介素－8(IL－8)

1. IL－8 的产生和受体

IL－8 是由单核细胞产生的一种中性粒细胞趋化因子。IL－1、TNF、LPS 和 PMA 均能诱导单核细胞、巨噬细胞、内皮细胞、成纤维细胞和表皮细胞合成和分泌 IL－8，且人类多种肿瘤细胞均可表达 IL－8。IL－8 分子量 8.3kDa，不成熟的 IL－8 为 99 个氨基酸，单核细胞产生的成熟 IL－8 分子量为 72 个氨基酸，内皮细胞产生的成熟 IL－8 分子量为 77 个氨基酸。

IL－8 受体有 IL－8RA 型和 IL－8RB 型，两型受体在氨基酸水平上有 77% 同源性。IL－8RA特异性结合 IL－8，为高亲和力，受体主要分布于中性粒细胞、单核细胞、T 细胞和

黑色素瘤细胞。IL－8RB 除与 IL－8 结合外，还可与其他受体结合，如分布在中性粒细胞和髓样细胞前体细胞系的受体。

2. IL－8 的生物学功能

(1)趋化和激活中性粒细胞，发挥其溶酶体酶的活性和吞噬效应。IL－8 激活中性粒细胞后，能促进Ⅰ型和Ⅲ型补体受体的表达，从而参与免疫调节和促进细胞黏附。

(2)趋化嗜碱性粒细胞，并刺激其释放组胺，可能与速发型超敏反应的发生有关。

(3)趋化部分静止的 T 淋巴细胞，这种趋化作用需要单核细胞同时存在。局部注射 IL－8可使局部和引流区淋巴结 T 细胞明显增多。IL－8还可明显趋化 IL－2 活化的 NK 细胞。

内毒素脂多糖可诱导体外分离培养的人外周血单核细胞产生 IL－8 因子。

3. 牙髓、尖周组织中的 IL－8:大鼠磨牙正常牙髓组织中有 IL－8 表达的阳性细胞，正常牙髓中 IL－8 表达细胞为成牙本质细胞层和牙髓中央区的圆形、椭圆形或纺锤形的 MΦ 和少量成纤维细胞。正常人牙髓组织只有微弱的 IL－8 表达，不可逆性牙髓炎的牙髓组织 IL－8 表达增高。成牙本质细胞是最初接触外源微生物刺激的牙髓细胞，与牙髓免疫细胞和树突状细胞密切相关，在牙髓免疫反应中可能具有先天的适应性反应。在采用 RT－PCR 和 Western blot 杂交证实静息状态下，成牙本质细胞表达低水平的 IL－8，当暴露于 LPS 时，其表达水平增高，表明成牙本质细胞有能力调节早期的炎症反应，积极参与中性粒细胞的聚集过程，对抗外来微生物的侵入。内毒素炎症牙髓组织中，IL－ 8 主要分布于炎细胞浸润区周围的单核－巨噬细胞、血管内皮细胞、部分成纤维细胞。用 LPS 刺激体外培养的人牙髓成纤维细胞可表达 IL－8 mRNA，表明人牙髓成纤维细胞是免疫反应性细胞。IL－8 在急性牙髓炎的渗出物中的表达明显高于慢性炎症，表明 IL－8 在牙髓炎的发生和发展过程中可能起重要作用。由于 IL－8 对中性粒细胞所具有的特异性趋化作用，使炎症过程中的中性粒细胞定向迁移和组织浸润，在宿主抗感染和调节免疫反应中起促进作用，或许加重炎症反应和组织破坏。因此，正常牙髓组织中的 IL－8 可能担负着防御外来抗原入侵的功能，而牙髓炎症中的 IL－8 则参与早期的炎症反应过程，并可能影响炎症病变的程度和转归。尖周炎症病损伴有疼痛症状的患者 IL－8 表达水平较高，提示 IL－8 在尖周病的发展过程中可能起关键作用。

三、肿瘤坏死因子

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)是 1975 年由 Carswells EA, Old LJ, Kassel RL 等首先发现的，可使敏感肿瘤发生出血和坏死，而无损于正常细胞功能的细胞因子。

(一)TNF 的产生和分类

近年，TNF 的研究进展甚速。现已明确，TNF 是机体发生应激反应时，主要由激活的单核－巨噬细胞产生的内源性多向性蛋白调节因子。巨噬细胞是产生 TNF 的主要细胞，机体不同部位的巨噬细胞受各种刺激后都有产生 TNF 的能力，且单核细胞、NK 细胞和 B 细胞等也能产生 TNF 和 TNF 类似物。刺激因子中的淋巴因子与内毒素的联合作用最佳。此外，一些肿瘤细胞本身在一定条件下也能产生 TNF 。机体内的许多病理因子都是 TNF 合成的促进剂。1985 年 Shalaby 把巨噬细胞产生的 TNF 命名为 TNF－α，把 T 淋巴细胞产生的淋巴毒素(lymphotoxin, LT)命名为 TNF－β。TNF－α 是一种单核因子，TNF－β 是一种淋巴因子，抗

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

原和丝裂原均可刺激 T 淋巴细胞分泌 TNF－β。人 TNF－α 前体由 233 个氨基酸残基组成，含 76 个氨基酸残基的信号肽，切除信号肽后成熟型 TNF－α 为 157 氨基酸残基，分子量为 17kDa；小鼠 TNF－α 前体为 235 氨基酸残基，含 79 个氨基酸残基信号肽，成熟型 TNF－α 为 156 氨基酸残基，分子量也为 17kDa。人 TNF－α 与小鼠 TNF－α 有 79%的氨基酸同源性。人 TNF－β 是由 205 个氨基酸残基组成，成熟型为 171 个氨基酸残基，分子量为 25kDa；鼠 TNF－β 由 202 个氨基酸残基组成，成熟型为 169 个氨基酸残基，与人 TNF－β 有 79%的同源性。

（二）TNF 受体

TNF 受体是一种糖蛋白，是 TNF 直接作用于细胞的位点，是其生物学作用的基础。主要分布于肝、肾、肺、皮肤、胃肠道和心血管系统，其数目因组织细胞不同而有所差异。一些细胞，特别是人的单核细胞有 TNF 的两个结合位点，亲和力有高低之分，其中低亲和力受体在数量上远大于高亲和力受体。虽然细胞的 TNF 受体数目和种类不同，但细胞对 TNF 细胞敏感性并不取决于受体数目。

TNF 受体可分为两型：Ⅰ型和Ⅱ型。两型受体均包括胞膜外区、穿膜区、胞浆区 3 个部分。TNF－α 和 TNF－β 的受体可能是相同的，它们均与同一 TNF 受体结合，它们的生物学作用相似，但两分子的编码基因不同，组织中检测到的多是 TNF－α。

（三）TNF 的生物学作用

TNF 具有广泛的生物学作用，主要表现在两方面：

1．抗肿瘤和免疫调节作用：TNF 在体外可杀伤培养的肿瘤细胞，在体内可引起肿瘤出血和坏死。目前，对它杀伤肿瘤的机制还不十分清楚。TNF 的抗肿瘤作用可能与以下因素有关：

（1）可能它与相应受体结合后，改变靶细胞糖代谢，使细胞内 pH 降低，导致细胞死亡。

（2）通过 TNF 对机体免疫功能的调节作用，促进 T 细胞及其他杀伤细胞对肿瘤细胞的杀伤。

（3）TNF 作用于血管内皮细胞，损伤内皮细胞或导致血管功能紊乱，使血管损伤和血栓形成，阻断肿瘤组织的局部血流而发生出血和缺氧坏死等。

TNF 除对多种肿瘤细胞具有直接杀伤作用外，并可显著提高机体对外部刺激的免疫功能。

单核－巨噬细胞和淋巴细胞的聚集和活化是机体组织损伤时细胞反应的一个显著标志，TNF 可通过调节这些细胞功能活动来调节机体或局部组织的免疫力。例如：

①TNF 可刺激单核－巨噬细胞前体细胞分化。

②激活 T 淋巴细胞，诱导 IL－1、IL－2、IL－6、IL－8 等白细胞介素产生，并促进 IL－2 受体和主要组织相容性复合物（MHC）Ⅰ类和Ⅱ类抗原的表达。

③增强有丝分裂原和外来抗原刺激 B 细胞的增殖和 Ig 分泌。

④通过诱生干扰素、CSF 等多种细胞因子调节免疫细胞活性，增强机体免疫防护能力。

2．TNF 是介导炎症反应的重要炎症因子之一：在炎症过程中，TNF 通过对循环细胞特别是中性粒细胞和血管内皮细胞的多方面作用，造成机体许多病理生理方面的影响：

（1）创伤后，局部的血管内皮细胞经 TNF 刺激，引起形态和功能上的变化，使通透性增强，加重局部组织炎性水肿和炎性细胞浸润。

(2)创伤局部产生的 TNF 能吸引单核－巨噬细胞、淋巴细胞至损伤部位,并刺激这些细胞释放更多的炎性调节因子,如 IL－1、PGEα 等,以及增加这些细胞的细胞毒性作用。

(3)TNF 对多形核白细胞(PMNs)具有趋化作用和多种影响,包括诱导其脱颗粒,释放溶酶体;增加 PMNs 凝集作用,促进其黏附于血管内皮细胞;诱导产生超氧离子;增强 PMN 的吞噬作用和细胞毒作用等。其中,TNF 促进 PMNs 黏附于血管内皮细胞的作用被认为是 PMN 诱导内皮细胞损害的先决条件。

TNF 对机体造成的许多病理生理方面的影响,都可归结于其对血管内皮细胞和中性粒细胞的作用,它可通过各种途径造成血管内皮细胞损伤出现微血栓,引起血管调节障碍,导致组织损伤。

TNF 是通过对炎性细胞聚集和活化作用的影响调节创伤炎症反应过程的。

3. 调节创伤愈合:创伤组织修复是一个复杂的协调过程。与创伤局部微环境密切相关。创伤局部产生的 TNF 可调节创伤愈合,其调节的因素可能有:

(1)TNF 对内皮细胞的趋化作用,诱导胶原形成毛细血管样结构。

(2)TNF 的直接血管生成作用。

(3)TNF 刺激纤维母细胞的复制,促进成纤维细胞增殖和分泌胶原酶等,从而局限组织损害和促进创伤组织的修复和改建。实验证实,在正常和损伤动物局部应用 TNF－α 后,伤口抗张强度(wound breaking strength)增加,说明 TNF 可以调节创伤的愈合。

但是,TNF 作用于不同细胞并与受体特异性结合后产生不同的生物学效应,主要表现为促进细胞生长和抑制细胞生长的双重作用,TNF 可刺激人二倍体成纤维细胞复制,提高牛的内皮细胞趋化性,高浓度的 TNF 可抑制内皮细胞增殖,甚至产生杀伤细胞效应。为此,在获得大量 TNF 促进创伤组织修复资料的同时,也有部分实验得出的结论与之相反。例如,TNF 可抑制胶原和纤维黏连蛋白(fibronetin, Fn)合成和创伤炎症期肉芽组织的形成。Solomon 等(1991)认为 TNF－α 可降低伤口抗张强度和胶原基因的活性,局部应用 TNF 治疗对创伤愈合不利。Steenfos HH, Hunt TK, Scheuenstuhl H 等(1989)认为应用 TNF 并不能改善创伤愈合过程。

Fajardo LF, Kwan HH, Kowalski J 等(1992)认为 TNF 对新微血管的生成具有双重作用,主要取决于它在局部组织中的浓度,低浓度时诱导血管生成,而高浓度时则抑制血管生成等。由此看来,TNF 对创伤作用的研究结果是相当矛盾的,实验结论往往不能完全反映实际条件下创伤愈合中 TNF 的作用。因此,有关 TNF 对组织修复的报告应考虑以下几点:①不同实验者实验条件的差异;②作用的细胞种类以及使用的 TNF 浓度不同;③不同的给药途径可引起不同的结果。

目前,人们对 TNF 在组织损伤修复中的作用尚不大清楚,仍在探讨和研究之中。

4. TNF 在应用方面的注意事项:

(1)TNF 促进创伤修复作用与所采用的载体有关。在 PBS 液中 TNF 很快被降解,而在胶原和白蛋白液中可缓慢释放,以利在局部创面形成高浓度 TNF 而发挥作用。

(2)TNF 在创伤修复中是一种局部介质,局部给予 TNF 能促进创伤修复,而全身应用则无直接作用。

(3)低浓度的 TNF 能促进创伤修复,较高浓度时这种促进作用可能转为抑制。因此,选择适当的浓度对 TNF 的生物学活性十分必要。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

(4)TNF本身与其他因子之间具有相互促进或拮抗作用,因此,合理配伍也十分重要。

TNF对创伤修复中肉芽组织的基质增生、毛细血管形成及上皮覆盖等过程均有明显作用。Steenfors将不同浓度的TNF作用于鼠背部创伤模型,检测肉芽组织中总蛋白、DNA和羟脯氨酸含量,发现TNF在低浓度时有促进修复作用,高浓度时有抑制组织修复作用。如果将TNF与PDGF使用,上述指标均下降。由此看来,TNF与其他细胞因子作用可能具有协同效应或拮抗效应。TNF是一种多功能调节因子,可作用于多种组织细胞,发挥多种生物调节作用,在免疫反应和炎症反应方面及提高正常组织内环境稳定的调节能力方面均起重要作用。现已证实,TNF调节多种细胞和细胞的代谢与功能活动,主要是通过自分泌和旁分泌的局部分泌方式,作用于细胞膜上的TNF受体而发挥生物效应的。

5. TNF生物学作用的多样性:

(1)TNF受体存在于几乎所有被检细胞,如巨噬细胞、淋巴细胞、多形核白细胞、成纤维细胞、内皮细胞等。

(2)TNF活动可导致多种信号传递旁路、激酶和转录因子。

(3)TNF活动可导致许多基因的活化。

不同细胞表面TNF受体数目和亲和力有很大差异,并且细胞表面受体数目与该细胞对TNF的敏感性无平行关系,平均每个细胞有103~104个TNF受体。TNF活动大多通过与其受体结合而介导,因此,对TNF受体的研究无疑对阐明TNF在炎症和修复过程中的作用有重要意义。

(四)TNF在牙髓尖周病中的作用

在牙髓组织的创伤、炎症和修复过程中,TNF的生物学功能也起重要作用。其中,TNF诱发炎症反应和具有刺激某些正常细胞生长的生理功能也许是重要环节。

在感染病变过程中,内毒素和TNF的关系十分密切,LPS可诱导TNF的产生,而TNF又介导内毒素的生物学效应。许多研究证明:LPS的许多生物学效应并不是直接的,而是通过TNF和IL-1实现的。因此,在牙髓病、尖周病的发病机制中,由内毒素诱生的TNF和IL-1可能是炎症过程中重要的始动机制。

Kamran用ELISA方法检测了感染根管中的TNF,发现根管渗出液中TNF的含量为124~4 900 ng/mL。在尖周炎渗出期,TNF活性相当高。TNF-α和IL-β能使体外培养的人牙髓细胞Ⅰ型胶原和LN表达下降,对DNA合成影响较弱,能完全抑制ALPase活性。IL-1α和TNF-α在正常和免疫缺陷小鼠的尖周病损中均有表达,阳性染色细胞与病损大小成正比。ELISA方法检测健康牙髓、无症状牙髓炎和有症状的可逆性牙髓炎TNF-α的水平,发现各组间有明显的区别,提示TNF-α有可能成为不可逆性牙髓炎的炎症程度的一个客观指标。LPS可通过与靶细胞作用,诱导TNF-α细胞因子合成和分泌。这些靶细胞包括单核-巨噬细胞、B淋巴细胞、粒细胞、血小板、成纤维细胞和内皮细胞等。其中单核-巨噬细胞是LPS作用的主要靶细胞。最近研究证实,以具核梭杆菌、产黑色素厌氧杆菌为代表的感染根管优势致病菌LPS在有血清的条件下,能诱导单核细胞产生较高浓度的TNF-α、IL-6、IL-8等细胞因子,在缺乏血清时诱导能力下降,具核梭杆菌、产黑色素厌氧杆菌等细菌LPS诱导单核细胞分泌细胞因子的过程中依赖血清和细菌表面受体CD14,抗CD14抗体在血清的协同下能阻断低浓度(10ng/mL以下)LPS诱导单核细胞产生细胞因子。CD14是细胞膜蛋白家族成员之一,是一种分子量为54×10^3 Da的糖蛋白,以糖基磷脂酰肌醇

(glycosyl phosphotidyl inositol, GPI)锚附于细胞膜表面。GPI 上的蛋白称为锚蛋白,CD14 也属于 GPI 蛋白。研究表明,单核细胞、巨噬细胞能表达 CD14,而未激活的粒细胞、T 细胞、B 细胞不表达 CD14。CD14 不仅存在于膜表面,还可作为可溶性分子自膜表面游离至血清或体外培养的单核细胞上清液中。在 LPS 诱导单核细胞应答的实验中,抗 CD14 抗体能够阻断内毒素脂多糖-内毒素脂多糖结合蛋白(LPS-LBP)与单核细胞膜表面的结合,从而抑制 TNF-α 细胞因子的产生。

采用组织形态学和免疫组化研究表明,在内毒素血症致牙髓组织病理学改变中,牙髓组织不仅出现血管扩张、充血,炎细胞着边、浸润和广泛微血栓形成等现象,而且发现 TNF 广泛分布于牙髓组织和牙周组织的血管内皮细胞中,对照组和抗体保护组则未见 TNF 的出现。说明内毒素血症时出现的以弥散性血管内凝血或微血栓为特征的组织损伤中,TNF 的作用更具重要意义。

研究还表明:大鼠磨牙正常牙髓组织中有 TNF-α 阳性细胞的表达,大鼠内毒素性炎症牙髓中也有 TNF-α 的表达,且参与了早期的炎症反应过程。牙髓组织中的 TNF-α 阳性细胞主要是单核-巨噬细胞、中性粒细胞和血管内皮细胞。

四、转化生长因子-β

转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)是一组调节细胞生长和分化的超基因家族,现已证实属于这一家族的成员包括转化生长因子 β1~β5、骨形成蛋白(bone morphogenetic proteins, BMP2~13)、活化素(activins)、抑制素(inhibins)、苗勒氏抑制物质(Mullerian inhibitor substance, MIS)等。TGF-β 的命名是根据这种细胞因子能使正常的成纤维细胞的表型发生转化而确定的,即在表皮生长因子(EGF)同时存在的条件下,改变成纤维细胞附壁生长特性而获得在琼脂中生长的能力,并失去生长中密度依赖的抑制作用。TGF 有三种类型,即 TGF-α、TGF-β 和 TGF-γ,其中在胚胎发育、形态发生、细胞分化、组织增生以及在炎症修复过程中起重要作用的主要是 TGF-β。TGF-β 最初是由 de Larco JE, Todaro GJ(1978)在小鼠纤维细胞的无血清培养上清液中分离得到的。以后 Roberes 等从肿瘤细胞、胎儿生殖器组织细胞和许多正常组织细胞培养上清液中也分离出 TGF-β。而后,TGF-β 从人血小板、人胚胎、牛肾中提纯出来,目前已经获得人 TGF-β1~β3 及 BMP 2~13 的相应 cDNA 克隆,并在原核和真核细胞中进行表达和表达产物的纯化。

(一)TGF-β 的产生

TGF-β 由多种正常细胞和组织产生,如单核细胞、中性粒细胞、成骨细胞、成纤维细胞、巨噬细胞等,其中血小板和骨组织中的 TGF-β 最为丰富,血小板中的含量是其他正常组织的 10~100 倍。此外,TGF-β 还存在于循环血液或损伤修复、炎症反应的局部组织内。许多转移的细胞,如星形细胞瘤、神经胶质瘤、人结肠癌和乳腺癌细胞等也可产生。

哺乳动物组织中的 TGF-β 目前已鉴定出三个亚型,即 TGF-β1、TGF-β2 和 TGF-β3。TGF-β1 在体细胞系中所占比例最高(>90%),活性最强,成为研究的主要对象。成熟型 TGF-β1 为一同源双体肽,分子量为 25 kDa,由两条相同的 12.5 kDa 亚单位肽链通过二硫键联结而成,每条单体肽链含 112 个氨基酸。细胞初期合成的 TGF-β 为一大分子量的非活化型前体,经加工处理后方产生 12.5 kDa 单体。

人、牛、猪 TGF-β 的氨基酸序列完全相同,人与鼠的 TGF-β 仅一位氨基酸残基不同,

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

其同源性高达 99%，表明在进化过程中，TGF－β 氨基酸序列得以高度保留。在不同种属中，TGF－β 的同源性相当高。

组织细胞分泌的和重组表达的 TGF－β 都是由无活性的前体形式存在。TGF－β 前体复合物必须活化才有显著的生物学活性，其体外活化方法有：

1．pH < 3.5 或 pH > 12.5。

2．加热至 90℃，5min。

3．加入增溶剂 SDS(0.02%)或脲 8mol/L。

4．加入纤溶酶。

体外活化方法在体内不大可能实现。前体复合物在体内的活化可能通过局部区域释放蛋白水解酶或特异活化因子引起该复合物水解或解离。对 TGF－β 前体活化调控格外重要，因前体复合物有较长的半衰期，在循环系统内可以维持较长时间不被分解，有充分条件到达靶细胞。通过形成 TGF－β 前体复合物，可以限制 TGF－β 活性，防止不必要的效应产生。

（二）TGF－β 的受体

TGF－β 的多功能生物学作用均由其相应的受体所介导，因此，TGF－β 受体日益受到关注，近年的有关研究已取得很大进展。TGF－β 受体是一种存在于细胞表面的跨膜蛋白，广泛存在于正常细胞和肿瘤细胞表面，完全检测不到 TGF－β 受体的情况很少见，仅人视网膜母细胞瘤细胞系缺乏 TGF－β 受体。每一细胞拥有的受体数目在 600～8 000 个，静止细胞的受体亲和力较生长细胞明显下降。最近发现 TGF－β 受体存在着三种不同的形式，它们的分子量分别为 53 kDa、70～85 kDa 和 250～350 kDa(Ⅰ、Ⅱ和 Ⅲ型）。Ⅰ、Ⅱ型 TGF－β 受体均为糖蛋白，它们和 TGF－β1 的亲和力要比和 TGF－β2 的亲和力大 10～80 倍。Ⅲ型受体是一种蛋白聚糖(proteoglycan)，它与 TGF－β1 和 TGF－β3 的亲和力相似，是 TGF－β 主要的结合形式，可能在 TGF－β 发挥生物学功能中起着主要作用。一般细胞均能表达三种受体，但受体数目分布依动物种系、细胞类型和培养条件的不同而不同。静止细胞的受体亲和力较生长细胞有明显下降。TGF－β 在进化过程中具有高度同源性，TGF－β 受体在各种细胞中的普遍存在，表明 TGF－β 及其受体较其他生长因子在细胞生理过程中有着更重要的作用，同时表明对 TGF－β 的反应是细胞生存的基础。

（三）TGF－β 的生物学功能

TGF－β 的生物学功能十分广泛，主要功能是调节细胞生长和分化，调控细胞外基质蛋白的形成。它对不同细胞的生长作用不同，对某些细胞(如上皮细胞)的生长起抑制作用，对有些细胞，如间充质细胞或中胚层源细胞的生长起双向调节作用。TGF－β 对不同类型细胞的分化也表现为促进和(或)抑制的双重作用，TGF－β 可以以不同的作用方式增加细胞外基质的含量，也可阻止已合成的细胞外基质的降解，包括降低基质蛋白降解酶的合成和增加基质蛋白降解酶抑制物的合成等两种作用。

正常细胞大多分泌非活性 TGF－β，机体依据生理功能的需求，激活和调控 TGF－β 的生物学作用。TGF－β 对各种细胞的作用很复杂，其主要表现是：

1．促进和(或)抑制细胞的增殖：在细胞的生长过程中，一方面它能促进成纤维细胞、成骨细胞和雪旺氏细胞的生长，另一方面它能抑制上皮细胞、角化细胞、内皮细胞、肝细胞、肠和支气管上皮细胞及其 T、B 淋巴细胞增殖，抑制再生肝细胞的合成。尽管 TGF－β 抗细

胞增殖作用的机制目前尚不十分清楚，但可以肯定与 PDGF 和 EGF 的作用途径完全不同。TGF－β 抑制细胞增殖的效应可能与其拮抗其他肽类生长因子的促细胞分裂作用有关。

有研究表明：在正常情况下，肝组织中的内皮细胞及肝上皮细胞可以产生并分泌 TGF－β，当肝部分切除而肝细胞再生后，肝内尤其是富含内皮细胞的非实质区内 TGF－βmRNA 的含量显著增多，这说明肝组织修复时，非实质区内皮细胞等细胞的 TGF－β 增多，产生的 TGF－β 反过来又对肝细胞、内皮细胞的生长产生反馈性的抑制作用（旁分泌抑制作用），以防止肝细胞的无限生长。而内皮细胞本身又受自产的 TGF－β 抑制（自分泌抑制），进一步防止了产生过多的 TGF－β。这种反馈性的抑制作用说明 TGF－β 受体信号能够作为细胞进一步复制的调节信号，选择性地降低促增生基因的表达而发挥其细胞生长抑制作用，这一作用很可能是通过对其他肽类因子促进增殖信号的阻抑作用来完成的。

2. 促进细胞外基质形成：细胞外基质（ECM）是组织细胞形态发生、生长、分化的重要调节因素，ECM 控制着细胞的迁移、增殖、分化、代谢和功能，而 TGF－β 可以以不同方式增加多种 ECM 的含量，如促进胶原蛋白、纤维黏连蛋白的表达和合成。TGF－β 对细胞外基质的调节作用，是通过降低基质蛋白降解酶的合成以及增加基质蛋白降解酶抑制物的合成两种作用来完成的。从而通过促进基质合成增加，减少已合成基质分解两个途径，使细胞外基质大大增加，显然这对细胞的形态发生、增殖和分化过程起着重要作用，有利于胚胎发育和组织细胞修复。

3. 免疫调节作用：TGF－β 在机体免疫系统中具有广泛的影响，免疫系统中的多类细胞，如 MΦ、单核细胞、中性粒细胞及 T、B 淋巴细胞等都能分泌表达 TGF－β，许多免疫细胞胞膜表面都有其受体存在，并表现出对其刺激的特异性的反应性。目前认为，TGF－β 是免疫系统中重要的负调节因子。

TGF－β 可通过以下途径表现免疫抑制效应：

（1）抑制免疫活性细胞的增殖。

（2）抑制 B 淋巴细胞分化为免疫球蛋白分泌细胞。

（3）抑制 T 淋巴细胞产生淋巴因子。

（4）抑制细胞毒 T 细胞、自然杀伤细胞和淋巴因子激活性杀伤细胞的活化等。

临床研究证实：TGF－β 的过度表达确与机体免疫抑制状态有关。某些肿瘤，特别是恶性胶质细胞瘤患者的免疫功能抑制，可能是由于肿瘤细胞中 TGF－β2 高水平的合成与分泌所致，当肿瘤被切除后，机体又可以恢复相当正常的免疫功能。鉴于 TGF－β 的免疫抑制功能，目前将 TGF－β 作为免疫抑制剂应用于异体脏器移植以降低免疫排斥反应的研究正在进行之中。

TGF－β 的生物学效应是广泛而复杂的，它的双重行为的生物学基础目前还不十分清楚，其重要意义还有待于阐明。

（四）TGF－β 对组织修复的作用

组织愈合的基础是炎症细胞和修复细胞的一系列活动。在软组织中，主要的炎症细胞有单核/巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞等，主要的修复细胞有成纤维细胞、血管内皮细胞等。TGF－β 影响着参与愈合的所有类型的细胞。

现在认为 MΦ 是组织修复的"指导者"，在损伤愈合中十分重要。TGF－β 作为外周血单核细胞的趋化剂，吸引它们聚集到伤口。体外研究发现，TGF－β 在生理浓度时就能趋化

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

单核细胞,单核细胞的迁移和向 MΦ 的转化对于启动组织修复至关重要。炎症区域较高浓度的 TGF－β 可进一步激活 MΦ。活化的 MΦ 又可释放大量的生物活性物质,如 PDGF、FGF 等生长因子。这样 TGF－β 在体内的一些作用是间接的,它可能是吸引、活化单核细胞,刺激它们生成有丝分裂原和(或)化学趋化物质,通过这些物质再作用于其他细胞如成纤维细胞、内皮细胞等而发挥效应,促进肉芽组织的形成。

成纤维细胞的移行和合成细胞外基质是组织愈合的关键过程。TGF－β 可吸引成纤维细胞到受伤部位,并增加其基质的形成能力。其促进基质产生和抑制基质分解的具体机制是:

1.直接增加成纤维细胞胶原和 Fn 的合成。

2.通过促进成纤维细胞合成和分泌纤维蛋白溶酶原激活物的抑制物,降低丝氨酸蛋白酶、硫基蛋白酶、金属蛋白酶和胶原酶的合成和分泌,抑制已合成基质的水解。

3.对基质形成的间接作用。例如提高 Fn 受体的合成;促进 MΦ 合成更多的 TGF－β,为成纤维细胞合成更多的基质提供了有利条件。TGF－β 对细胞外基质合成的促进作用是它在组织修复中的关键作用。

TGF－β 是一种血管诱生因子。在三维胶原培养中,它可诱导内皮细胞形成血管样结构。在体内,TGF－β 可能间接诱导血管生成,TGF－β 对细胞外基质的诱导作用可能是血管内皮细胞分化成毛细血管的重要信号。TGF－β 可作为单核/巨噬细胞、成纤维细胞的趋化因子,而这些细胞又可释放血管诱生因子,TGF－β 通过这些因子间接影响血管生长。

许多动物实验应用了外源性的 TGF－β。结果发现,伤口局部一次性使用 TGF－β,使用后 3～5d 可观察到损伤处有更多的单核细胞和成纤维细胞,肉芽组织生长旺盛、排列有序,小血管含量远远高于对照组。以含胶原和肝素的海绵为载体,观察到 TGF－β 对豚鼠表皮损伤有明显的促进愈合作用。对开放性深度创伤,TGF－β 可增加伤口的抗断裂强度。外源性 TGF－β 还可逆转某些药物和放射性损伤所造成的伤口愈合受阻现象。

(五)TGF－β 在牙齿胚胎发育过程中的作用

在牙齿胚胎发育过程中,TGF－β 参与了成牙本质细胞的分化调节。

牙胚发育期间充质细胞中存在 TGF－β。钟状期造釉器上皮和牙乳头细胞即有 TGF－β1 分布,细胞内的 TGF－β1 位于外釉上皮、内釉上皮和成牙本质细胞顶端,细胞外的 TGF－β1 主要位于星网层和牙乳头(D'souza RN Happonen RP, Flanders KCB, 1990)。牙胚的内釉上皮、成熟的成牙本质细胞、成釉细胞均出现 TGF－β 阳性信号(Jepsen S, Schiltz P, Strong DD 等,1992)。在鼠牙胚发育过程中,成牙本质细胞有 TGF－β1、TGF－β3 的表达。牙上皮只有和牙乳头间充质共培养时才表达 TGF－β1 mRNA,而和非牙间充质共培养时不表达。在鼠磨牙牙乳头培养液中加入 TGF－β1,牙乳头组织中的前期成牙本质细胞并无充分分化,而当 TGF－β1 与肝素或纤维黏连蛋白(Fn)复合时则出现成牙本质细胞样的分化(Ruch JV, Lesot H, Begue－Kirn C, 1995)。

从而推测:TGF－β 在牙本质形成早期调节细胞增殖,晚期调节细胞分化,牙胚发育过程中存在着 TGF－β 的旁分泌和自分泌机制;TGF－β 在牙胚中可能发挥上皮诱导作用,诱导成釉细胞和成牙本质细胞分化;TGF－β 在参与成牙本质细胞分化调节过程中需要某些细胞因子的协同作用;TGF－β 对牙齿生长发育产生影响,对成牙本质细胞的分化作用是重要的。

(六)TGF－β 对牙髓细胞的作用

在动物牙髓细胞培养中发现,TGF－β 可促进牙髓细胞的 DNA 和骨钙素合成(LianRF,

1990, Nakashima M,1992)。牙本质基质中存在的 TGF-β 可使牙髓细胞表达成牙本质细胞表型,调节牙髓细胞活性(Lesot H, 1993, Smith AJ, 1995)。TGF-β 可诱导牙髓细胞极化,发生成牙本质细胞样的功能分化,若用抗 TGF-β 单抗预先使 TGF-β 失去活性,则这种诱导作用消失(Dimitrios J, 1995)。TGF-β1 用于狗牙盖髓,在 1 周后即可见极化的成牙本质细胞样细胞的出现,3 周后有管样牙本质形成,表明 TGF-β1 能诱导牙髓细胞分化,参与修复性牙本质的形成(Tziafas D, Papadimitriou S, 1998)。采用器官培养方法观察 TGF-β1 ~ β3 对牙本质-牙髓复合体的作用,结果显示 TGF-β1 和 TGF-β3 能刺激牙髓细胞分化为成牙本质细胞样的细胞,并有胞外基质的分泌,而 TGF-β2 作用微弱(Sloan AJ, Smith AJ, 1999)。在观察 TGF-β1 对体外培养的人牙齿薄片的作用的实验中,观察到 TGF-β1 能直接参与牙髓细胞的增殖、迁移和胞外基质的合成(Melin M, Joffre - Romeas A, Farges JC 等,2000)。Northern blot 杂交检测到大鼠切牙牙髓中有 TGF-β1、TGF-β2 和 TGF-β3 mRNA 的转录本存在。将 TGF-ββ1 加入体外培养的牙髓牙本质体复合物中,发现 TGF-β1 能诱导成牙本质细胞分化,上调基质分泌,表明 TGF-β 超家族成员在牙齿发育和修复过程中可能起关键作用。另外,免疫组化染色显示:健康和龋坏的人磨牙中的成牙本质细胞和牙髓细胞表达 TGF-β Ⅰ型和Ⅱ型受体,成牙本质细胞中表达量最强,原位杂交也证实 TGF-β Ⅰ型和Ⅱ型受体在成牙本质细胞和牙髓细胞内有表达。从受体水平表明了 TGF-β 与牙髓组织的损伤修复有密切关系。以上观察结果表明,作为牙髓细胞的丝裂原,TGF-β 在牙髓细胞的分化中发挥了积极的诱导作用,TGF-β 可能通过刺激牙髓细胞增殖分化、诱导胞外基质合成,参与牙髓组织修复。

TGF-β、EGF 是两种具有多种生物学功能的生长因子,广泛存在于正常组织中,以自分泌或旁分泌形式调节组织和细胞的生物学活动,在许多病理和生理过程中起着关键的调控作用。在牙髓炎症和修复过程中几种生长因子的变化的体内实验发现,正常牙髓中成牙本质细胞虽无 TGF-β、EGF 合成,但当存在慢性刺激时,成牙本质细胞(特别是反应性牙本质下方的成牙本质细胞)呈明显的 TGF-β、EGF 阳性反应,表明成牙本质细胞在受到外界刺激后,具有合成和分泌 TGF-β、EGF 的能力,从而通过它们的作用进一步影响牙髓的防御和修复反应,其中成牙本质细胞是牙髓自身修复潜能的重要细胞学基础。

此外,邻近洞底的牙本质小管和新沉积的反应性牙本质基质中也有 TGF-β 的阳性染色。已经证实:牙本质中含有 TGF-β 等多种生长因子,将牙本质溶于 20% EDTA 时,可见有释放出来的 TGF-β。因而推测,牙本质基质中的 TGF-β 的来源可能是成牙本质细胞分泌的,或是由钙化牙本质释放而来。这两个来源的 TGF-β 和 EGF 通过刺激成牙本质细胞的基质合成而促进反应性牙本质的沉积,参与牙髓的防御反应。龋病和磨损引起的反应性牙本质的形成可能是由牙本质中释放的 TGF-β 所介导的。

TGF-β 在牙髓炎修复过程中具有双向调节作用,一是介导逆转炎症反应的负反馈机制,一是与其他内源性活性物质一起参与组织修复。TGF-β 在牙髓修复中一个不可忽视的作用是它可以抑制过强的炎症反应,阻止因抗原刺激所造成的免疫损伤,对保护牙髓组织有重要意义。细菌及其毒性产物不仅具有直接的致伤作用,更严重的是引发免疫反应造成的组织损害。炎症和损伤牙髓中存在丰富的 TGF-β,可能吸引中性粒细胞、单核-巨噬细胞到炎症前沿。中性粒细胞释放水解酶和过氧化物酶激活 MΦ 等,激活的 MΦ 又可释放或激活大量炎症因子,如 IL-1、IL-2、IL-8、TNF-α 等,从而导致组织的炎症和损伤的修

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

复。炎细胞的聚集和活化有助于消灭入侵的微生物和有害物质，在炎症早期有积极作用。但由于这些炎性介质和炎性细胞的作用是非特异性的，所以持续的炎症反应同时可以造成组织结构破坏和代谢紊乱。TGF－β 作为一种免疫抑制剂，可以抑制 MΦ 产生 IFN－γ、IL－1、IL－2、IL－6 、TNF－α 等炎性因子；抑制 INF－α 等炎性因子；抑制 INF－γ 刺激的 MΦ 合成 NO；诱导单核细胞分泌 IL－1 拮抗剂；拮抗 TNF－α 等的生物学活性，此外还可以抑制多种免疫细胞的增殖和活化。TGF－β 对炎性因子的抑制作用对于限制这些因子介导的炎症反应是具有重要意义的。

在实验性大鼠尖周炎病损中，观察到 TGF－β1 阳性的巨噬细胞分布在急性期根尖周围和骨吸收区，慢性期时，TGF－β1 阳性的成骨细胞紧靠修复性骨形成区域，表明 TGF－β 1 在尖周病的发展过程中可能起双重作用。鉴于细胞因子的网络关系，牙髓细胞内存在一个内容丰富、关系复杂的细胞因子网络系统，精细地调节着它的功能。例如炎症早期，TGF－β 和 TNF－α 趋化和激活多种炎症细胞，炎细胞浸润到组织中并进一步合成分泌其他活性因子，介导炎症反应。若病源性刺激持续存在，炎细胞过度活化 ，炎症介质持续合成，TGF－β 等负反馈调节因子不足以抑制过强的炎症反应，最终导致组织坏死。若刺激减弱或消除，组织则调节炎症因子的合成，以 TGF－β、EGF 等生长因子的活性为主，修复反应得以进行。而且 TGF－β、EGF 协同促进修复细胞的分化增殖和基质合成，最终导致组织的修复。因而，对细胞因子在牙髓炎症、修复过程中的调节作用的研究，不仅有助于提高对牙髓炎症和损伤修复机制的认识，而且也提示，如果采用适宜方法促进组织内有益因子的合成或抑制有害因子的产生，或合理外用生长因子则可有助于损伤牙髓的修复。

五、骨形成蛋白

骨形成蛋白，又称骨形态发生蛋白（bone morphogenetic protein，BMP），是在骨组织中提取的具有成骨诱导（osteoinduction）作用的酸性低分子多肽，是由 Urist 于 1965 年首先发现并报道的重要骨诱导因子。此后，人们对 BMP 作了大量的研究。1988 年以来，Wozney JM，Rosen V，Celeste AJ 等，先后又发现了 8 种 BMP 基因，它们分别为 BMP1、BMP2A、BMP2B、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7 等。现已将 BMP1～8 克隆化，其中 BMP1 具有蛋白酶样结构，BMP2～8 均属转化生长因子 β（TGF－β）类，对细胞外基质（ECM）的成分，如胶原（collagen）、纤维黏连蛋白（Fn）的产生起促进作用。在 BMP 家族成员中，除 BMP1 仅能诱导软骨形成外，其他的 BMP 在单独应用时均能诱导软骨和骨的形成，其中 BMP2 的诱导骨活性最强，其他的 BMP 可能与 BMP2 有协同关系，共同参与诱导成骨过程。

（一）BMP 的分布和功能

1989 年，成功地制备抗牛骨形成蛋白生物活性位点的单克隆抗体（bBMP－McAb），并采用免疫组化方法进行研究，研究结果表明：BMP 广泛分布在骨基质的胶原纤维、新生的骨基质、成骨细胞和骨髓细胞中。

BMP 在成骨诱导中的作用有：

1．BMP 可在软组织和骨缺损中诱导血管周围的未分化间充质细胞转化为软骨和骨母细胞，进而形成软骨和骨组织。

2．BMP 在诱导骨形成过程中往往经过细胞的增殖、分化和骨组织形成等阶段。在细胞增殖期，BMP 周围有大量未分化间充质细胞增殖和核分裂相；在细胞分化期，有大量的间

充质细胞生长活跃,核分裂明显,并向软骨母细胞和骨母细胞分化形成新骨。

3. BMP 可加速骨质缺损的修复,在不能自行愈合的各类骨质缺损中,均能诱导骨质生长,修复骨质缺损,形成骨质的量与 BMP 的量成正比。目前已利用 BMP 这一特性,成功将其用于颌骨缺损、颌骨囊肿及牙槽骨缺损修复的临床治疗。

对 BMP 的大量研究还证明:这种蛋白没有种属的特异性,人和牛骨的 BMP 抗原决定簇是相同的,人、猴、牛和鼠的骨基质中提取的 BMP 具有同源性(homology),这为临床应用牛骨 BMP 修复人的骨缺损提供了可靠的依据。由于 bBMP - McAb 不仅是一种有效的检测 BMP 标记和显示物,而且具有专一封闭 BMP 诱导新骨形成的功能,因而可以使用这种单克隆抗体有效地封闭 BMP 的作用,达到抑制骨生长和骨形成的目的,为骨肉瘤、软骨肉瘤等骨肿瘤及与之相关的骨疾病的临床治疗开拓广阔前景。

(二)牙胚发育中的 BMP

近年,在采用 bBMP - McAb 对牙齿和牙胚的研究中证明,在牙板、帽状期冠部的内釉细胞以及其后钟状期的成釉细胞、外釉细胞、成牙本质细胞中都含有丰富的 BMP,并发现随着牙本质的形成,BMP 直接沉积在前期牙本质中。在牙胚中能分泌 BMP 的细胞主要是造釉器上皮细胞、牙乳头细胞、成牙本质细胞和牙囊细胞。造釉器细胞具有合成和分泌 BMP 的功能,成熟的成牙本质细胞也具有合成和分泌 BMP 的功能,成牙本质细胞在形成牙本质基质的同时也将胞浆中的 BMP 分泌出来并沉积在牙本质基质中,这部分 BMP 对于今后的牙齿形成及萌出后牙本质的损伤修复具有重要作用,说明在牙齿发育和形成的复杂以及连续的生物学过程中,BMP 是至关重要的。

(三)BMP 在牙髓修复中的作用

骨形成蛋白是一种高效的骨诱导因子,人们对 BMP 在牙髓修复中的作用也进行了研究。Nakashima M(1990)观察了狗牙的 BMP 盖髓后修复性牙本质的形成状况,结果最先表现的是轻微的细胞介导的免疫反应和 BMP 吸收,而后是间充质细胞的增殖和血管的侵入,最后是骨样牙本质和管样牙本质的形成。Nakashima 认为 BMP 可促进牙髓间充质细胞增殖,诱导成牙本质细胞分化和骨样、管样牙本质形成。高玉好(1992)等在 BMP 诱导牙本质形成的实验中,将高度纯化的 BMP 置于创面上,每颗牙约用 500μg。结果,BMP 盖髓后 2~3 周即开始有骨样牙本质和管样牙本质形成,并形成了完整的牙本质桥,骨样牙本质中有成骨细胞样细胞埋入,管样牙本质中有清晰的牙本质小管和成牙本质细胞。管样牙本质散布于骨样牙本质中,两者相互移行。从形成牙本质桥的组分看,既有规则的管样牙本质,也有大量不规则的骨样牙本质,这可能与 BMP 在组织中的扩散有关。用 BMP - 7 对小型猪进行盖髓实验,观察到骨样和管样牙本质形成,并在穿髓处形成完整牙本质桥。同样在大鼠盖髓实验中,也观察到 BMP - 7 能诱导修复性牙本质形成。因为 BMP 盖髓后在组织中能很快扩散,BMP 颗粒成为牙髓细胞分化的中心,距离 BMP 较近的细胞分化为成熟的成牙本质细胞。继而形成典型的管样牙本质,稍远的牙髓细胞由于得不到足够的分化信息而分化为不成熟的牙本质细胞,形成骨样牙本质。从而证实:BMP 可以诱导骨样牙本质和管样牙本质的形成。同时,在临床治疗中,BMP 盖髓的效果不低于氢氧化钙,显示出了 BMP 在临床保存活髓治疗方面的应用前景。

但是,BMP 是一种蛋白质,在体内易被吸收,且不能提供硬组织沉积的支架。因而,作为盖髓剂,BMP 的应用有其局限性。BMP 的应用不仅受到其绝对用量和纯度的影响,而且

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

载体也是一个十分重要的因素。

目前常用的载体有牙本质陶瓷和各种生物活性材料，如羟基磷灰石(HA)、磷酸三钙(TCP)等。有人将 BMP 与牙本质陶瓷复合用于盖髓，发现诱导的牙本质主要是骨样牙本质，并与牙本质陶瓷颗粒相互融为一体，组成完整的牙本质桥。BMP 与牙本质陶瓷复合后，形成了 BMP 缓慢释放系统，其中的 BMP 缓慢向周围释放，作用于牙髓细胞，延长了 BMP 有效作用时间，减少了绝对用量。在 BMP 的临床应用中，若将 BMP 与载体复合，再配以不影响 BMP 生物诱导活性的抗生素、镇痛药物等，以满足临床的诱导作用、消炎镇痛、X 线阻射等要求，其临床疗效可望更好。

(四)微环境对 BMP 诱导作用的影响

在 BMP 的研究中，人们提出一个微环境问题，即局部环境对骨诱导过程可能具有一个从促进到抑制的影响范围。不论在体内还是在体外实验中，骨诱导的成功非常有赖于局部微环境的作用，因该环境可以允许一些调节因子在宿区或植入区发挥作用。未分化间充质细胞在特定环境中，在受到 BMP 诱导分化的同时，还受到其他因子或因素的作用，使得未分化间充质细胞在不同的微环境状况下受到 BMP 诱导而向着不同方向转化，因而出现了在牙髓和牙乳头中向成牙本质细胞转化，在牙周组织环境中向成牙骨质细胞和骨母细胞转化而形成牙骨质和牙槽骨等现象。因而，今后在对 BMP 骨诱导的研究中，应包括对局部微环境的未知调节因子或因素的研究。

(五)BMP3 的有关研究

在人们对 BMP 相继进行研究时，Sampath 等用肝素亲和层析及反相高效液相色谱技术从牛脱矿骨基质中提取到一种不同于 Urist BMP 的骨诱导蛋白，命名为成骨素(osteogenis)。Luyten FP, Cunningham NS, Ma S 等(1989)将纯化的成骨素降解，分离后进行氨基酸序列分析，发现其与 TGF－β 超家族的部分蛋白有高度同源性，与 Wozney 在哺乳动物真核细胞表达的 BMP3 的氨基酸序列基本相同，因而多数学者认为成骨素就是 BMP3。

BMP3 即成骨素，归属于 TGF－β 超家族，其分子量为 30～40 kDa，为一种疏水性非胶原糖蛋白，为二硫键结合的二聚体结构。实验研究发现，成骨素与载体结合后可通过诱导激活成骨细胞表型的表达而具有骨诱导活性，其骨诱导活性较 Urist 的 BMP 的骨诱导活性大 1 000 倍，即 1～5μg 成骨素诱发的新骨量相当于 1～5mg Urist BMP 的成骨量。当成骨素经还原和烷基化后，其分子量为 22 kDa，且诱导活性消失。

成骨素与肝素、羟基磷灰石、刀豆素 A、胶原等复合有很强的亲和力。Reddi 等(1991)发现牛成骨素与Ⅳ型胶原的亲和力很强，与Ⅰ、Ⅸ型胶原的亲和力则相对较弱。而血管基底膜上Ⅳ型胶原的含量极丰富，成骨素与其相关的 TGF－β 同新生血管的基底膜结合，在局部诱导骨分化过程中发挥重要作用。Vukicevic S, Paralkar VM, Cunningham NS 等(1990)用放射自显影技术研究了大鼠胚胎发育过程中牛成骨素在软骨和骨的结合位点显示：中胚层来源的组织，包括软骨(膜)、骨(膜)结合位点数最多，而其他组织，如肌肉、肝、脾、皮肤、脑、心、肾和肠的结合位点数依次递减，说明它在骨形态发生中亦有重要作用。Vukicevic S, Helder MN, Luyten FP(1994)指出，成骨素尽管最初是从骨基质中分离出来，但也可由其他组织合成，并可能调节人胚肺、肾、小肠的形态发生和(或)功能调节。

BMP3 在机体内广泛分布于神经外胚层来源的组织和细胞，不仅具有成骨作用，而且参与胚胎分化过程。Tabas JA, Hahn GV, Cohen RB 等(1993)采用 cDNA 探针杂交技术对 BMP3

在体细胞染色体进行定位研究，发现 BMP3 基因位点与Ⅱ型牙本质发育不良的基因位点相重叠，提示 BMP3 在牙本质形态发生及发育过程中可能发挥重要作用。

在采用地高辛甙元标记的 cDNA 探针研究不同状态下牙髓组织中 BMP3 mRNA 的分布特征时发现，健康牙髓组织中的血管内皮细胞、成牙本质细胞即有合成 BMP3 的能力，浅龋、深龋和(或)局限性炎症的牙髓组织中 BMP3 合成的量增加，表明在龋源性炎症刺激下，BMP3 基因激活表达，并参与牙髓细胞的诱导分化过程。其中，值得注意的是，人牙髓血管内皮细胞不仅有合成和分泌 BMP3 的能力，而且在修复性牙本质形成的龋病牙髓组织中，在其下方的血管周围出现了 BMP3 mRNA 阳性杂交信号的未分化间充质细胞和牙髓细胞。表明血管内皮细胞也可以通过合成分泌 BMP3 参与牙髓细胞的诱导分化过程(旁分泌作用)；同时还可以直接移行分化为未分化间充质细胞，所合成分泌的 BMP3 作用于自身(自分泌作用)或分化增殖为新的内皮细胞。此外，由于内皮细胞始终与血液相接触，它合成的 BMP3 有可能分泌入血，随血液循环到达牙髓的各个部位，参与牙髓组织的生理活动。因此，通过对 BMP3 的研究，证实了牙髓血管内皮细胞在牙髓自身修复中的重要作用。

六、成纤维细胞生长因子

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)最早是从牛脑垂体中发现的，是对成纤维细胞具有明显生长促进作用的因子。后来发现，除成纤维细胞外，FGF 对中胚层来源的细胞，尤其是血管内皮细胞也有明显的增殖作用。体内几乎所有组织均含有 FGF 或具有 FGF 样活性物质。

(一)FGF 的分类和产生

FGF 的种类十分繁多，根据 FGF 的等电点，可将 FGF 分成两大类，即酸基性的 FGF (aFGF)和碱基性的 FGF(bFGF)。二者都是分子量为 15～18 kDa 的单链蛋白，相互之间有 55%的同源性，可作用于同一受体，并发挥相似的生物学效应。不同动物来源的 bFGF 非常相似。bFGF 广泛分布于各种组织，是由多种细胞，包括 MΦ、成纤维细胞、血管内皮细胞等合成。根据作用的靶细胞不同，bFGF 的某些生物学效应比 aFGF 强 30～100 倍。由于 aFGF 和 bFGF 的生物学活性受 TGF-β 的正向或负向调节，因此，当不同组织合成 FGF 或 TGF-β 的能力以及微环境中这些因子相对浓度发生变化时，可选择性地促进或抑制细胞的分裂和分化。两类 FGF 的生物学活性的特点是，酸性 FGF 与肝素结合后活性可以显著增加，它们的靶细胞主要来源于中胚层衍生的细胞。

(二)FGF 受体

FGF 受体可能是一种单链多肽，分子量 110～150 kDa，每个细胞上的受体数 2 000～80 000。aFGF 和 bFGF 是通过同一受体发挥生物学作用的。该受体具有两个结合区，其特点是不进行酪氨酸磷酸化，但却是一种依赖钙和磷脂的物质，具有苏氨酸特殊 C 蛋白激酶的活性。

尽管 bFGF 与 aFGF 在体内的分布十分广泛，但目前在除脑组织外的许多组织中要确定合成 FGF 的 mRNA 却十分困难，即使在 FGF 增加时也很难见到 mRNA 的增加。因此有人认为，FGF 在正常情况下可能有一种储藏形式，以应付紧急情况下的需要，如创伤修复等，这一点可能受到靶细胞局部调节作用的影响。

(三)FGF 的生物学作用

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

FGF的体外作用十分强烈,在ng/mL浓度范围内即可对BALB-C3T3、人和牛的羊水成纤维细胞、牛的角膜上皮细胞等产生强烈的增殖作用;FGF有促骨细胞有丝分裂作用,成骨细胞可产生aFGF和bFGF,bFGF的活性形式存在于细胞外基质中,作为一种自分泌或旁分泌性因子发挥生理功能,增加骨细胞内骨钙素含量,降低细胞内碱性磷酸酶活性和胶原产物。在FGF家族中,bFGF是最早被纯化和鉴定的成员,对其生物学效应的研究比其他成员多,已成为该家族的代表。

FGF在体内的生物学作用有:

1. 强烈促进成纤维细胞的增殖,参与血液凝固后的创伤愈合。

2. 参与神经再生过程。

3. 刺激血管新生。

4. 参与肿瘤的生长等。

FGF分布于多种组织,作用广泛,可诱导大多数来自中胚层和神经外胚层的培养细胞的有丝分裂,稳定培养细胞表型的表达,促进毛细血管内皮细胞的增生和细胞的分化,在胚胎形成、血管新生、神经营养和创伤愈合等方面起着重要作用。

(四)FGF在创伤修复中的作用

FGF在创伤修复中的作用主要来源于它对成纤维细胞、平滑肌细胞、骨骼肌成纤维细胞等间充质细胞的强力促有丝分裂作用,它不仅刺激这些细胞增殖,同样也可以促进其分化。

1. 有关bFGF在创伤修复中的作用,在Buntrock进行的一系列研究中得出以下结论:

(1)FGF可以刺激创伤修复中的肉芽组织的再生,这种再生包括细胞与细胞外基质的再生,以及FGF直接作用于靶细胞,即成纤维细胞与内皮细胞的结果。

(2)FGF可以显著刺激毛细血管再生,增加肉芽组织中的血液供应。

(3)FGF对组织修复作用有剂量效应依赖关系,因FGF的迅速降解,只有反复应用才能维持其刺激生长效应。

(4)增生的胶原组织中含有Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原,其中以Ⅲ型胶原的羟脯氨酸含量最高,Ⅰ型胶原含量低。

组织损伤后内源性产生或外源性加入的bFGF可以通过以下途径促进愈合:

①通过趋化作用和促细胞迁移作用,导致MΦ、间充质细胞、内皮细胞、成纤维细胞等向创伤部位聚集,启动创伤愈合过程。

②促进几乎所有参与创伤愈合的细胞增殖,刺激细胞外基质的合成。

③促进新生血管形成。

④促进细胞释放胶原酶、血纤溶激活酶。

2. aFGF在创伤修复中的作用,主要表现在内皮细胞生长因子(endothelial cell growth factor, ECGF)的效应上,因ECGF是aFGF分类中的一种,在体外能够有效地促进血管内皮细胞及成纤维细胞生长,在体内能够促进血管增生,与肝素结合后其促分裂活性大为增加。已有的研究表明,aFGF在创伤修复中可参与以下反应:

(1)促进肉芽组织增生,加速伤口愈合。因在肉芽组织中毛细血管内皮细胞与成纤维细胞是主要细胞,ECGF不仅能促进血管内皮细胞的分裂增殖,加速毛细血管形成,同时还能促进成纤维细胞的生长,以及胶原合成。

(2)ECGF 是人血管内皮细胞体外传代培养不可缺少的物质，它作为血管衬里，除了起屏障作用外，还有抗血栓形成，调节血管平滑肌的增殖与收缩反应，参与某些物质代谢与转化等功能。

(3)促进角膜上皮生长，用于角膜损伤的治疗。

(4)促进软骨、骨细胞再生，用于骨折的治疗。

aFGF 为自分泌生长因子，参与正常创伤修复过程，促进上皮细胞增殖及创伤愈合的作用比 bFGF 强。

总之，FGF 通过诱导一系列有益于组织修复的细胞反应，促进创伤愈合过程，如吸引有关细胞到达伤口，刺激细胞释放基质降解酶到达伤处，刺激成纤维细胞的增殖和新的细胞外基质的合成。因此，FGF 类物质促进创伤修复的作用是肯定的，无论是 bFGF 还是 aFGF，从实验研究和临床应用都得到证实。但如何设计一种适宜的装置来释放 FGF 进入创伤组织，使 FGF 能更好地发挥生物学效应，是一项有待研究的工作。

通过 FGF 对体外培养的人牙髓细胞 DNA 合成和胞外基质的作用研究，发现 bFGF 明显促进 DNA 的合成，促进Ⅰ型胶原、Fn 的合成以及 ALP 活性增加。FGF 可使 DNA 合成量提高 182%。aFGF 和 bFGF 均可刺激原代培养的牛牙髓细胞 DNA 合成，使 ALP 活性下降。在对 bFGF 在人牙胚中表达的免疫组化定位研究中发现，钟状期牙胚中内釉细胞层和成牙本质细胞层 bFGF 为强阳性；牙乳头组织中阳性细胞分布不均，其中牙乳头的血管内皮细胞也为强阳性。鉴于牙源性上皮、成牙本质细胞和牙乳头间充质细胞中均有 BMP2 的杂交信号分布，表明 bFGF 在牙胚发育中的表达与 BMP 相似，它们在诱导外胚层、中胚层的发育中起着协同作用，共同促进内釉上皮向成釉细胞和牙乳头细胞向成牙本质细胞的分化。外源性的 aFGF 可使培养的牙胚体积增大，而且可调节牙齿发育的大小和速度。FGF 是牙胚发育不可缺少的生长因子。用 bFGF 进行狗牙盖髓，发现不能诱导管样牙本质形成，但能刺激骨样基质形成。表明 bFGF 在牙髓损伤修复过程中也能发挥一定作用。

七、血小板衍生生长因子

血小板衍生生长因子(platelet - derived growth factor, PDGF)作为一种普遍存在的促有丝分裂剂，最初是由于它对培养于全血清的间充质细胞的促分裂活性而被发现的。迄今为止，PDGF 的理化性质、生物学活性、作用机制和创伤修复中的重要作用等方面的研究均取得了很大进展，受到医学界的瞩目。

Balk SD(1971)首先观察到正常鸡胚的成纤维细胞在经热处理(56℃, 30 min)的血浆培养基中，细胞出现很快分化与增殖的现象，据此推测，有某种能刺激细胞增殖的致丝裂因子在血液凝固过程中从血小板里释放出来，或从血浆前体物质中转化而来，并且这种致丝裂因子作为一种“损伤激素”能在组织损伤部位引起细胞的增殖。Ross, Kohler(1974)等分别证实了一种血小板的提取物能够在体外促进猴动脉平滑肌细胞和鼠的 3T3 细胞增生。可见上述促细胞增殖的活性物质就是在凝血过程中从血小板释放的 PDGF。由于 PDGF 在创伤愈合过程中起重要作用，故又被人们称之为“创伤因子”，其作用受到人们越来越大的关注。

(一)PDGF 的存在方式和来源

近十多年来，人们成功地分离出人、猪、羊的 PDGF，而最早是从人血小板中提取的。人

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

的 PDGF 是一种多肽、糖蛋白,分子量为 2.78×10^4 Da 和 3.47×10^4 Da。每种 PDGF 分子含 16 个半胱氨酸残基,活性 PDGF 是由 A、B 两条不同的链通过二硫键连接。Deuel 等证实 PDGF 在体内有两种形式,即 PDGFⅠ和 PDGFⅡ。两者在氨基酸以及糖类的组成上虽然有所不同,但其促丝裂活性相似。Harlan JM, Thompson PJ, Ross RR(1986)等认为 PDGF 在体内存在两种方式,一种是以无活性的前体存在于细胞内,另一种是以活性的方式结合于产生 PDGF 的细胞膜上,这种方式与白细胞介素-1 的分泌有些类似。正常人体内的 PDGF 几乎检测不到,而通过静脉注入狒狒体内的 PDGF 的半量清除时间也只有 2min。因此,全身结缔组织细胞与 PDGF 的反应可能不是依靠循环中的 PDGF 来发挥作用的,而是 PDGF 的局部合成与分泌效应。

研究已证实:体内能合成与分泌 PDGF 的部位除血小板以外,激活的巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞以及平滑肌细胞等在调节 PDGF 基因转录因子的控制下均能产生 PDGF。故 Ross(1989)将 PDGF 的来源分为循环细胞产生的、固定细胞产生的以及转化细胞产生的三种类型。但总的来讲,在与创伤修复关系中,以人血小板的 PDGF 与重组的 BB 型的 PDGF 研究最多。

(二)PDGF 的受体

PDGF 的许多生物学效应是通过靶细胞膜上存在的特异性受体而得以实现的。PDGF 受体有 A 型和 B 型,其中 A 型能与所有的 PDGF 分子结合,而 B 型受体仅与 PDGF-BB 相结合。

深入研究表明:每种受体又是由 α 和 β 两处亚基以一定方式构成的,其中 α 亚基能与 PDGF 的 A 链和 B 链结合,β 亚基只能与 B 链结合。因此,PDGF-BB 能与三种形式受体(αα, αβ, ββ)结合;PDGF-AA 则只能与 αα 形式受体结合;而 PDGF-AB 既能与 αα 受体结合又能与 αβ 受体结合。PDGF 受体亚基模型以及不同形式 PDGF 与其亲和的情况:

1. 受体亚基:PDGF 受体亚基存在两种类型,即 α 亚基和 β 亚基。α 亚基可结合 PDGF A 链和 B 链;β 亚基只结合 B 链。在配基结合之前,PDGF 受体亚基以独立的单体存在于细胞表面或松散地联成二聚体。

2. 受体类型:两个亚基能形成三种类型的高亲和力 PDGF 受体,即 αα、αβ、ββ 受体。

3. 受体结合:PDGF-AA 只能结合到 PDGFαα 受体上,而 PDGF-AB 即能结合 PDGFαα 受体也能结合 αβ 受体;PDGF-BB 能结合到所有三种类型 PDGF 受体。

PDGF 受体主要存在于间充质细胞,包括成纤维细胞、成骨细胞、软骨细胞、平滑肌细胞、神经胶质细胞和微血管内皮细胞等。

(三)PDGF 的生物学功能

PDGF 生物学功能的主要表现为:

1. 对细胞的趋化作用。

2. 对细胞生长的直接和间接作用。

3. 对细胞基质成分的调节作用等。例如 PDGF 对结缔组织如成纤维细胞、平滑肌细胞的趋化性可使细胞向创伤部位迁移,并在那里刺激细胞增殖,这在创伤修复中起着关键作用。

(四)PDGF 在创伤修复中的作用

PDGF 与创伤修复的关系十分密切,它能直接或间接地参与炎症反应、细胞增殖等组织

修复的全过程。

当组织发生损伤时释放 PDGF,对中性粒细胞、单核细胞、成纤维细胞以及平滑肌细胞等发生趋化作用,吸引这些细胞向受损部位迁移。这一过程是通过 PDGF 作用于靶细胞后使磷脂酰肌醇转变,释放出花生四烯酸,引起前列腺素类物质增加而产生的。释放的 PDGF 的另一大特征是促进成纤维细胞、神经胶质细胞、平滑肌细胞的有丝分裂,使细胞由 G1、G0 的静止期进入到细胞周期的增殖期,促进 D 型胶原合成,增加胶原酶的释放,刺激伤口生长,促进伤口愈合。

采用酸醇抽提,离子交换吸附和凝胶层析方法,可以从新鲜牛血小板中提取 bPDGF。bPDGF 可促进处于静止状态的 3T3 细胞 DNA 合成增加。bPDGF 是一种阴离子多肽、耐热(100℃)、耐酸(pH2.5)及耐受 2%SDS 的作用。bPDGF 具有良好的体内活性,可以促进伤口处肉芽组织生长,上皮再生,使动物创伤伤口加速愈合。

(五)PDGF 对牙髓、尖周组织细胞的作用

PDGF 可以诱导许多细胞在不同时间产生多样的生物学效应,尤其是诱导细胞的定向迁移和直接、间接的细胞增殖作用,常常与结缔组织的形成有关。因此, PDGF 的作用引起了口腔医学的重视。Blom S, Holmstrup P, Dabelsteen E(1994),Matsuda N, Lin WL, Kumar NM 等(1992)等研究发现 PDGF 能刺激牙周膜成纤维细胞的有丝分裂,人基因重组的 PDGF 或人血小板纯化的 PDGF 均可诱导人牙髓成纤维细胞、牙周膜和牙龈成纤维细胞的 DNA 合成增加。PDGF-BB 对体外培养的人牙髓细胞具有明显的促进增殖作用,降低Ⅰ型胶原及 laminin 的合成,提示 PDGF 有可能调节牙髓细胞分化为成牙本质细胞。

EDTA 溶解的人牙本质基质内含有许多血循环来源的生长因子,其中含有高浓度的 PDGF-AB,提示 PDGF 在牙本质-牙髓复合体的修复性反应中可能起重要作用。正常牙髓组织中的牙髓细胞、微血管内皮细胞表达 PDGF β 受体,提示这两种细胞是 PDGF 的靶细胞,PDGF 可能在牙髓组织的生长、发育等正常生理过程与创伤过程中起重要作用。

在尖周肉芽组织中的成纤维细胞、毛细血管内皮细胞有 PDGF β 受体表达。表明 PDGF 有可能刺激成纤维细胞、毛细血管内皮细胞产生生物学效应,在尖周病的修复中发挥作用。

在尖周肉芽组织中的浆细胞、巨噬细胞可表达 PDGF β 受体,推测作为靶细胞的浆细胞,MΦ 在 PDGF 作用下参与了慢性尖周病变的免疫病理过程等。

八、表皮生长因子

表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)是 Cohen 继神经生长因子(NGF)研究之后偶然发现的。1959 年,Cohen 在研究神经生长因子时发现,给新生小鼠注射含有 NGF 的唾液提取物后,新生小鼠眼睑早开,门齿早萌。1962 年,他分离出这种活性物质,因这种物质能刺激表皮的生长和角化,故取名为 EGF。一年以后,阐明了它的一级结构,成为最早明确结构的生长因子。EGF 是一种由 53 个氨基酸残基组成的单链,分子量 6.05 kDa,等电点 4,6,含 3 个二硫键。EGF 是一种生物学效应相当广泛的多肽生长因子。随着研究工作的深入,以后人们又对 EGF 在动物体内的来源、受体分布、生物学活性等进行深入研究,取得了巨大成果。

(一)EGF 的产生

颌下腺是 EGF 的主要来源和贮存位置。EGF 由颌下腺导管系统的颗粒曲管细胞产生,经导管进入口腔,成为唾液成分。唾液中的 EGF 吞咽后经胃肠道吸收再进入血液。此外,人

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

体小肠的 Brners 腺、幽门腺、胃底腺和肾脏等也可分泌 EGF，并且见于正常生理状态下的所有体液中，如唾液、胃液、尿液、前列腺液、乳汁、胆汁等。EGF 在体液中的含量较高，血浆含量较低。人 EGF 的物理、化学、生物活性与鼠 EGF 非常相似。EGF 亦有前体，是一种具有受体功能的膜蛋白，在 EGF 结合蛋白等因素作用下，组织中的 EGF 前体降解为 EGF。EGF 对热不敏感，不被胰蛋白酶、木瓜酶消化，这对稳定其结构，并发挥生物学作用是十分重要的。EGF 在小鼠体内的分布与人有所不同，小鼠唾液中的 EGF 含量比人高 500 倍，血浆中的 EGF 含量比人高 10 倍。

(二)EGF 的受体

使用^{125}I 标记的鼠 EGF 为探针，已在多种哺乳动物的组织或培养的细胞膜上检测出 EGF 受体。EGF 受体是一种糖蛋白，分子量约 150～170 kDa。EGF 受体在体内广泛存在，来自内、中、外三个胚层的细胞都有分布，如角膜细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞、表皮癌细胞、绒毛膜上皮癌细胞等。由于 EGF 受体可分布在三个胚层的组织和细胞中，因此，所含受体的类型和数目便因细胞类型和生长状态不同而有所差异。依据功能的不同，至少有 3 种类型的 EGF 受体：

1. 能与 EGF 结合并能引起效应的受体。
2. 能与 EGF 结合但不能引起效应的受体。
3. 既不能与 EGF 结合也不能介导 EGF 效应的改变了的受体。

其中，参与 EGF 结合的受体还可分来两大类：即高亲和性受体和低亲和性受体，前者仅占总数的 0.1%～10%。

EGF 的生物学活性是通过与靶细胞的受体作用后而得以发挥的，其过程包括结合、内吞、溶解和受体再循环利用等过程。EGF 与受体特异性结合后形成 EGF 受体复合物，继而在细胞膜上形成被膜小泡，最终与溶酶体融合而降解，这就是 EGF 的内化过程。EGF 与膜中的受体特异性结合后，可能引起受体构象的改变，引起质膜或胞内酪氨酸残基特异性的蛋白激酶从无活性形式转化为活性状态，对作用底物酪氨酸进行特异性磷酸化，从而启动刺激细胞增殖信号的途径。

(三)EGF 的生物学效应

EGF 的生物学效应非常广泛(表 9.1)，是一种强有力的细胞分裂促进因子，能促进体内、外多种细胞的分化和增殖，包括启动 DNA 的合成，激活 RNA 和蛋白质合成，增加细胞大分子如糖蛋白和氨基多糖的合成。体外培养中，EGF 可显著促进^{3}H－TdR 掺入组织修复细胞，主要为成纤维细胞，进而促进细胞分化与增殖，其最大促进作用发生在细胞培养的第 5～7d。

表 9.1 EGF 的生物学效应

EGF 诱导	生物学效应
整体水平	(1)加快皮肤组织、角膜上皮组织、肺和气管上皮的增殖与分化
	(2)强化甲基胆蒽的致癌作用
	(3)抑制胃酸分泌
	(4)提高鸟氨酸脱羧酶活性，尸胺积累
	(5)增加皮肤内二硫键成分
	(6)促进肝肥大与增生，脂肪肝形成
	(7)诱发腭裂
	(8)促进牙齿早萌以及眼睑睁开

续 表

器官培养	(1)加强皮肤组织、角膜上皮组织、乳腺上皮细胞的增殖与分化
	(2)增加 RNA 与蛋白质合成
	(3)提高鸟氨酸脱羧酶活性,尸胺积累
	(4)抑制腭板的融合
细胞培养	(1)增加 K^+、脱氧葡萄糖、α-氨基异丁酸盐的运输
	(2)激活糖酵解
	(3)刺激大分子合成(如透明质酸、RNA、DNA、蛋白质)
	(4)增加细胞增殖,改变膜的性质
	(5)促进角膜细胞角质成分产生
	(6)刺激与促进绒毛膜促性腺激素分泌
	(7)增加前列腺素的生物合成

EGF 可加快钙内流和磷脂酰肌醇代谢,从而促进 4,5 - 二磷酸磷脂酰肌醇转变为甘油二酯和三磷酸肌醇,后两者是新发现的第二信使,能控制细胞的分泌、代谢、增殖等过程。

EGF 可促进花生四烯酸代谢和前列腺素合成,影响骨和钙磷代谢。

EGF 还具有免疫抑制作用,可抑制免疫系统的功能和迟发型过敏反应,T_H 是 EGF 导致免疫抑制的靶细胞。

纯化的 EGF 可使胸腺、脾和骨髓中的 DNA 合成下降,而使其他组织中的 DNA 含量增加。

(四)EGF 对组织修复的影响

组织损伤之后,首先发生的是局部创面炎症反应,各种炎症细胞包括 MΦ、中性粒细胞、单核细胞和部分修复细胞等在早期均向伤口聚集,在这一过程中,EGF 起着趋化和调节的作用,促使各种炎细胞和组织修复细胞在损伤部位聚集。EGF 参与炎症的更主要的作用在于它能激活磷脂酶 A2 活性,从而促进上皮细胞释放花生四烯酸,通过调节环氧化酶与脂氧化酶的活性或含量影响前列腺素的合成。资料表明,EGF 还可通过促小分子物质的跨膜运动,增强透明质酸的合成或活性,以及增加肉芽组织中的血流量来调节炎症反应的强度。

在组织的修复中,EGF 可对整个肉芽组织中的纤维与基质的沉积起主导作用,而其他生长因子则可能只参与组织修复中某一阶段的反应,其作用无法与 EGF 相比。EGF 及其受体调节伤口愈合过程包括上皮再生、新血管化、细胞外基质的合成和改建,以及通过对其他生长因子的影响而促进创伤愈合。

EGF 对修复细胞的作用是通过与受体结合而发挥的。哺乳动物细胞上都存在 EGF 受体,其中以上皮细胞最为丰富,成纤维细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞上也存在很多 EGF 受体,体外细胞培养中,EGF 能刺激有 EGF 受体的细胞生长。在创面愈合过程中受 EGF 影响的主要细胞有上皮细胞、成纤维细胞、内皮细胞,EGF 是成纤维细胞的化学趋化剂,可吸引成纤维细胞到损伤部位,并促进它的有丝分裂和胶原合成等功能,与创面愈合直接相关。EGF 也是血管生成因子,培养的微血管的内皮细胞有 EGF 受体表达,体外实验证实 EGF 可刺激内皮细胞 DNA 合成,并促进内皮细胞的迁移和增殖,以及诱导人微血管内皮细胞形成血管样结构等。

基于对 EGF 在组织或细胞修复作用中的认识,有人应用 EGF 促进创面愈合。动物实

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

验表明:在大鼠的皮下植入海绵中放入稳定释放 EGF 的小药片,观察到肉芽组织增多,DNA 合成成倍增加,蛋白含量增加 33%,组织湿重增加。含 EGF 的羊毛脂用于猪浅度烧伤的皮肤创面,能加快上皮再生的速度,促进创面愈合。猪的中厚层皮肤伤口中局部应用 rhEGF,也能促进创面愈合。大量实验证实,外源性应用 EGF 对各类创伤模型的愈合均有效。临床应用表明,EGF 确实起到加速伤口愈合的作用。Brown 对 9 例难愈的慢性创面局部应用 EGF,8 例完全治愈。有学者观察了 EGF 对火器伤的治疗作用,发现应用 EGF 组在伤后不同时间比对照组伤口细胞增殖更活跃,数量更多,细胞分泌合成更旺盛,胶原形成更明显。目前,由于产生了基因重组 EGF,使临床上进一步扩大应用成为可能。

关于 EGF 促进组织修复的机制,有学者认为,EGF 的作用是一种非特异性的,可能是通过增加胶原合成细胞的数量,或直接刺激组织修复细胞内 DNA、RNA、蛋白质及细胞外大分子的合成等而实现。从氨基乙糖在肉芽组织中的增多来看,EGF 可能促进了羟脯氨酸在修复组织的沉积,从而加速愈合。EGF 的作用也受到其他生长因子的协同和拮抗作用的影响,如 EGF 受体的活性能被 PDGF 等多种因子抑制,EGF 通过成纤维细胞可增加细胞外基质葡聚糖合成,但在 TGF-β 存在的情况下可抑制胶原合成。

(五)EGF 对牙髓细胞的作用

牙髓细胞是一种具有成纤维细胞特性的多潜能细胞。牙髓损伤后,牙髓细胞的再生潜能是牙髓修复的生物学基础。EGF 能诱导大鼠克隆的牙髓细胞系细胞增殖,并呈剂量依赖关系。采用人工基因重组型 EGF 和^{3}H-TdR、^{3}H-Pro 细胞内掺入技术,观察 EGF 对人牙髓成纤维细胞(HPF)DNA 合成,以及 EGF-HAP 复合物对 HPF 生长及附着的影响等,结果发现 EGF 能够显著地促进 HPF 的 DNA 合成,EGF 在一定的浓度范围和作用时间内,对 HPFDNA 合成的刺激作用具有剂量和时间依赖效应,EGF 对 HPF 的蛋白质合成也具有明显的促进作用,EGF-HAP 可使 HPF 呈复层和密集的放射状生长等。对牙胚的研究发现,在成釉器发生时期,内、外釉上皮表达 EGF 受体,随着生长分化,星网状层也出现丰富的 EGF 受体。又有人发现:EGF 对体外培养的鼠帽状期牙胚星网层的形态有重要影响。外源性 EGF 可以刺激培养的牙胚的生长进程等,由此可见,EGF 对牙齿的发育起了重要作用。

在对牙髓炎症及修复过程中几种生长因子的分布与变化的研究中,发现 EGF 在牙髓组织中的分布随修复反应的变化而变化,修复反应中期,组织中含量最为丰富,修复反应的早期和后期其含量有所减少。这可能因为组织损伤的早期,细胞对创伤刺激的反应较弱,而中期是组织修复反应的旺盛阶段,此时丰富的生长因子有助于细胞的增殖分化和基质合成,以促进修复反应的进程 。后期牙髓修复已趋完善,通过自我调节,EGF 和 TGF-β 等生长因子的合成分泌逐渐减少,从而有助于避免组织的过度增殖,这是机体的正常生理调节现象。该研究推测,EGF 在牙髓组织中的另一个作用是通过刺激牙髓细胞的增殖和基质分泌而促进修复性牙本质的形成。

总之,EGF 可促进细胞的分化和增殖,促进组织修复,但在动物实验和临床应用 EGF 等生长因子时,需要解决的一大问题是,如何使生长因子能较长时间地保持其生物学活性和刺激组织的再生反应。有报道说,采用甲基纤维素化的 EGF 或与甲基纤维素化的胶原相交联的方法基本解决了这一难题。目前,在细胞培养和动物实验已取得肯定结果的基础上,国外已有学者开始将 EGF 应用于临床 。至于 EGF 在牙髓创伤修复中的应用尚有待于进一步研究。

九、胰岛素生长因子

胰岛素生长因子(insulin - like growth factor, IGF)是一族既有胰岛素合成代谢作用，又有生长促进作用的多肽。人血浆中的 IGF 主要有两种，分子量分别为 7.649 和 7.471 kDa。其中 IGF - Ⅰ为一种生长激素(GH)依赖性的碱性蛋白，等电点 8.6，内有 3 个二硫键桥。其组成的 70 个氨基酸中，有 48 % 的氨基酸顺序与人的胰岛素前体(human pro - insulin)具有同源性，而 IGF - Ⅱ则为一种中性单链多肽，GH 依赖活性较低，由 67 个氨基酸组成，其中约有 50% 的氨基酸排列与 IGF - Ⅰ和胰岛素相似。

(一)IGF 的合成和分泌

体内能合成和分泌 IGF 或 IGF 样多肽的组织和细胞相当广泛，并且影响其分泌的因素也很多，例如年龄、性别、怀孕、营养状况、生长激素、甲状腺素、催乳素、雌激素和负反馈等，在这些因素中，有的是促进 IGF mRNA 的转录，有的则是单纯增加 IGF 及细胞的分泌，但其调节机制主要由自分泌和旁分泌两种形式控制。在 IGF 的分泌中，细胞类型的特殊营养刺激(specific trophic stimuli)是决定局部 IGF 分泌浓度的主要因素，而旁分泌机制则对平衡循环血中的 IGF 浓度有重要影响。血浆中的 IGF 是与其特异性的载体蛋白相结合的形式存在的，载体蛋白主要存在于血浆外液之中。

(二)IGF 受体

机体内能合成和分泌 IGF 的细胞有 18 种之多，具有 IGF 受体的组织和细胞也很广泛，它们不仅存在于细胞膜上，同样在细胞内的滑面内织网与高尔基体等结构中也发现有 IGF 特异性结合位点。能与 IGF 相结合的受体有三种亚型，即Ⅰ型 IGF 受体、Ⅱ型 IGF 受体以及胰岛素受体。

(三)IGF 的生物学作用

IGF 与胰岛素对细胞周期有特殊的影响，但这种影响并非是 IGF - Ⅰ和 IGF - Ⅱ作为单一因子而发挥作用的，它们既不能单独促进静止的细胞进入增殖周期，也不能促进 DNA 的合成，其促分裂作用是在同其他生长因子(如 PDGF、FGF)的协同效应下共同完成的。IGF 的另一个主要作用是刺激细胞的分化(differentiation)和促进细胞的合成。有研究表明，IGF 对维持与细胞分化有关的蛋白质的水平是十分必要的。

IGF 的大部分生物学效应是与其他细胞因子相协同来完成的。在协同的细胞因子中，以 IGF 和 PDGF 的相互协同作用最为密切。

(四)IGF 在牙髓、牙胚发育中的作用

IGF - Ⅰ对牙髓细胞的生物学效应有多种，可刺激体外初代培养牛牙髓细胞的增殖及黏蛋白的合成。IGF - Ⅰ刺激体外培养的人牙髓细胞增殖，IGF - Ⅰ 和 IGF - Ⅱ促进胞外基质合成。IGF - Ⅰ能诱导大鼠克隆的牙髓细胞系细胞增殖，并呈剂量依赖关系。IGF - Ⅰ和 IGF - Ⅱ能增加狗牙髓细胞的 ALP 活性和 DNA 及胞外基质蛋白的合成，IGF - Ⅰ作用较强，提示 IGF - Ⅰ可能在牙髓细胞生长和分化过程中起主要作用。在牙胚发育过程中，前期成牙本质细胞和功能性成牙本质细胞都有受体的表达。在体外，IGF - Ⅰ对成骨样细胞的增殖作用等同于小牛血清，对体外培养的鼠磨牙牙胚的细胞分化作用同样如此。在无血清的培养条件下，牙胚的体积不能增大，牙本质基质的分泌不佳，成釉细胞不出现完全分化。IGF - Ⅰ加入培养后，牙胚体积增大，细胞分化更早，表明 IGF - Ⅰ可促进成牙本质细胞的分

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

化和成熟，调节分化后的细胞功能。IGF－Ⅰ还可能参与成牙本质细胞的极化过程，将分离17 d的鼠牙胚牙乳头组织于琼脂半固化培养液中培养，IGF－Ⅰ与肝素复合后，导致广泛的细胞分化。有意义的是，IGF－Ⅰ与肝素复合作用后诱导的成牙本质细胞不表达 TGF－β1的基因表型，这可能是细胞因子网络作用的结果。采用原位杂交方法观察 IGF－Ⅰ在大鼠切牙牙胚中的分布，结果提示 IGF－Ⅰ在牙胚发育过程中是以自分泌和旁分泌形式发挥作用的。

十、凝血因子Ⅷ

（一）凝血因子Ⅷ的产生和存在形式

凝血因子Ⅷ(blood coagulatipn factor Ⅷ)又称Ⅷ因子，是由内皮细胞产生的、与凝血过程密切相关的一种重要因子，它是由 Von Willebrand's Factor(vWF)与促凝蛋白组成的复合体，vWF 又称为Ⅷ因子相关抗原，是血小板吸附功能所必需的物质。以复合体形式存在的凝血因子Ⅷ可以保护促凝蛋白组分，使之不被蛋白分解酶灭活，人体正常组织中的动脉、静脉和毛细血管的内皮细胞、血小板及单核细胞上都有 vWF 存在，炎症反应性增生性血管病变中均可提取该因子，目前 vWF 已被作为内皮细胞的可靠标记物。

（二）凝血因子Ⅷ的功能

内皮细胞分泌的 vWF 直接进入血液中和周围结缔组织，可介导血小板与暴露的胶原和氨基葡萄糖黏附，成为分子之间的“桥蛋白”，在血管破损、渗透处，这种桥蛋白可以促进血小板凝血酶的合成，而且，vWF 还可与Ⅷ因子形成非共价复合物，防止这一初级阶段凝血因子从循环中过早排泄，在局部发挥有效的凝血。因此，通过对 vWF 的研究表明，血管内皮细胞在炎症时积极参与了凝血过程，它在组织自身稳定方面发挥了重要作用。

（三）内皮细胞的作用

由于内皮细胞始终与血液接触，所以它与循环调节、凝血、炎症、血管增生和免疫反应等生理、病理过程密切相关，特别是在炎症、免疫应答和血栓形成等情况下，内皮细胞成为主要的反应场所。在炎症过程中，细胞间质变性、局部血管通透性增高、血浆渗出均与内皮细胞的功能有关。

内皮细胞的功能繁多，其主要作用可以有：

1.内皮细胞可黏附炎性细胞，协助炎细胞向血管外渗出。

2.内皮细胞还可以产生以白细胞介素－1为主的多种细胞因子，而这些细胞因子和其他炎性细胞因子又可以促进血管新生。

3.内皮细胞与血液凝固和纤维溶解机制有关，在生理情况下内皮细胞的纤溶活性占优势，炎症时在细胞因子和细菌内毒素的刺激下则以凝血活性占主导地位，内皮细胞在慢性炎症中表达 Ia 抗原，参与免疫应答。

（四）牙髓中的凝血因子Ⅷ

Jacoby BH, Davis WL, Craig KR 等(1991)首次发现，炎症牙髓中 vWF 明显增高，认为此因子对牙髓的自身稳定和修复等方面的作用是有积极意义的。近年，对正常和炎症牙髓中的内皮细胞和 Von Willebrand 因子进行免疫组化的研究结果表明，正常牙髓中血管较少，多呈闭合状态，阳性着色强度均匀，位于全部血管壁的内皮细胞上。炎症牙髓中血管扩张，血管数目明显增多，约为正常牙髓的 2.27 倍，微血管截面积约为正常组织的 6.83 倍。正常

牙髓中 vWF 在血管壁上呈颗粒状阳性着色，同一血管染色强弱不一，炎症牙髓中 vWF 的染色强度明显增高，其着色范围大于内皮细胞，甚至扩展到血管腔内，说明炎症状况下内皮细胞积极参与了 vWF 的合成和分泌。

炎症牙髓中的血管内皮细胞显著增生和血管扩张，其意义在于增加病灶组织的氧供给，输送足够的营养物质维持组织、细胞的代谢，而且，作为免疫细胞的内皮细胞增强 Ia 抗原的表达，提高对抗原处理和提呈能力，动员炎细胞和免疫细胞，增强牙髓防御能力，促进病变愈合。在龋病病源物质的持续作用下，内皮细胞可介导粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞聚集在病变区，使炎症处于慢性状态，同时，内皮细胞增生、凝血活性亢进有助于避免血液成分的过量渗出而引起牙髓组织内压升高。

（文玲英）

第四节　牙髓的免疫应答

免疫(immune)是机体通过识别和排除抗原性异物，维持机体内环境稳定的一种特异性生理反应。机体的免疫功能是在淋巴细胞、单核细胞和其他有关细胞及其产物的相互作用下完成的。免疫系统是这些具有免疫作用的细胞及其相关的组织和器官构成的。因此，免疫系统的生理功能首先就是识别自己和异己抗原分子，并对它们产生相应的反应。

免疫应答(immune response)是抗原分子选择性刺激能识别它的特异性淋巴细胞，从而触发淋巴细胞自身的活化、增殖与分化以及产生免疫效应的生理过程。

抗原特异性淋巴细胞具有识别抗原分子的功能，这种识别功能是在遗传基础上于个体发育过程中形成的，抗原分子具有选择和触发抗原特异性淋巴细胞的作用，这种作用是机体免疫应答的动因。

免疫反应和免疫应答不尽相同。免疫反应是指免疫应答过程中所产生的抗体和致敏淋巴细胞与相应抗原特异性结合所发生的一系列反应。

一、免疫应答的类型和产生场所

（一）免疫应答的类型

一般情况下，免疫应答是机体免疫系统执行防卫功能的生物学过程，但是，在此种免疫保护的生物学活动中，也可能导致免疫损伤。因而，根据机体的免疫遗传和在内、外因素影响下所出现的免疫反应，可将免疫应答分为两大类。

1. 正常免疫应答

正常免疫应答是一种生理性免疫应答，是机体免疫系统在功能正常情况下对异己抗原表现出维护机体相对稳定性，发挥免疫监视和免疫保护作用的生理过程。例如抗感染免疫和抗肿瘤免疫等 。

2. 异常免疫应答

异常免疫应答是一种病理性免疫应答，是机体免疫系统在功能异常情况下对异己抗原或自身抗原表现出过高或过低的反应，前者表现为超敏反应(hypersensitivity reaction)和自身免疫性疾病，后者表现为反复感染和易发生肿瘤等。对异己抗原表现为无反应者为免疫缺陷。超敏反应、自身免疫性疾病和免疫缺陷均是对机体不利的免疫应答，属于免疫病理。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

免疫应答所产生的反应或是对机体有利的免疫反应，或是出现对机体组织有损伤的超敏反应，前者是生理性防御反应，后者是病理性的功能紊乱。通常超敏反应、变态反应（allergy）和免疫损伤（immune injury）等为同义词。

（二）免疫应答的产生场所

在免疫应答中，单核吞噬细胞系统和淋巴细胞系统的协同作用是特异性免疫应答产生的物质基础，而周围淋巴器官，特别是淋巴结和脾脏，则是免疫应答产生的主要场所。

进入机体的抗原或进入血流的抗原，通过淋巴循环进入引流区的淋巴结，或被滞留于脾脏，并被淋巴结和脾脏的巨噬细胞或其他抗原提呈细胞，如树突状细胞等摄取，尔后抗原提呈细胞将加工后的抗原再表达于细胞表面。与此同时血循环中的成熟T、B细胞经由淋巴组织中的毛细血管进入淋巴器官，并与其中相对应的抗原特异性淋巴细胞和抗原提呈细胞膜上表达的抗原接触后，再被活化、增殖和分化成为效应细胞。免疫应答的最终效果是产生体液免疫和细胞免疫。

二、免疫应答的过程

免疫应答是一个相当复杂的过程，由单核吞噬细胞系统和淋巴细胞系统协同完成，并依据介导效应的主要免疫细胞不同而分为B细胞介导的体液免疫和T细胞介导的细胞免疫。但在实际的免疫应答产生过程中，体液免疫和细胞免疫往往是相互伴随、相互联系和相互影响的。

一般将免疫应答过程分为3个阶段：

（一）感应阶段（inductive stage）

感应阶段是免疫细胞对抗原分子的识别，或抗原分子与免疫细胞相互作用的阶段。此阶段主要包括抗原提呈细胞对抗原的摄取、加工与提呈；以及抗原特异性淋巴细胞对抗原的识别等。

1. 抗原提呈细胞：抗原提呈细胞（antigen presenting cell, APC）是一类能够摄取和处理抗原，并能将处理后的抗原提呈给淋巴细胞，并致使淋巴细胞活化的细胞，抗原提呈细胞也称为辅佐细胞（accessory cell, AC）。血液中的大单核细胞和组织中的巨噬细胞是典型的抗原提呈细胞，抗原经巨噬细胞处理之后，其免疫原性可大大提高。此外还有树突状细胞和朗罕细胞等。而且B细胞也具有提呈抗原作用，尤其是活化的B细胞，其抗原提呈能力与巨噬细胞相仿。B细胞可凭借膜表面免疫球蛋白（SmIg）特异性地捕获抗原，这一优越性在提呈低浓度的可溶性抗原时表现尤为明显。

构成抗原提呈细胞的条件是：

(1)能够捕获、摄取和处理抗原。

(2)能将处理后的抗原片段再表达到细胞表面。

(3)细胞膜表面的MHCⅡ类分了与抗原片段交联，并将抗原信息提呈给淋巴细胞。

巨噬细胞向T细胞传递抗原信息时，多数是通过细胞表面直接相互接触来完成的。只有同时在膜上表达抗原片段和MHCⅡ类分子阳性的巨噬细胞才具有抗原提呈作用。

2. 抗原提呈细胞对抗原的摄取和处理：抗原的摄取主要发生在周围的淋巴器官中。当抗原进入机体后几分钟内就被输送到脾脏和淋巴结，并被其内的巨噬细胞和树突状细胞所捕获与摄取，而后进行加工和处理。

以巨噬细胞加工处理蛋白质抗原为例,其加工和处理的过程为:

(1)抗原经吞噬后被内化(internalized)形成吞噬体(phagosome),与溶酶体融合后形成吞噬溶酶体(phagolysosome),抗原在酸性囊泡内被多种水解酶所降解。

(2)抗原降解后其原先表面的一些抗原决定簇往往消失,随之出现的是一些在结构上展开了的蛋白质片断和多肽链,因而出现了一些新的抗原决定簇,使原先包裹在内部的抗原决定簇暴露出来。

(3)在胞浆内连续的膜系统中,粗面内质网合成的 MHC Ⅱ类分子可选择性地与吞噬细胞溶酶体降解产生的某些抗原片段结合,形成 MHC Ⅱ类分子与抗原片段的复合体,经过高尔基体转运到细胞膜表面,这种存在于抗原提呈细胞膜上的复合体能有效地将抗原信息提呈给抗原特异性淋巴细胞,完成了抗原加工处理的过程。

3. 抗原提呈细胞对抗原的提呈:表面有抗原片段的抗原提呈细胞通过与抗原特异性 T_H 细胞的直接接触和相互作用,将抗原提呈给 T_H 细胞。T_H 细胞在识别外来抗原片段的同时还要识别自身的 MHC Ⅱ类分子,此种识别称为双重识别。因而,只有 MHC Ⅱ类分子阳性的巨噬细胞才能向 T 细胞和 B 细胞提呈抗原。巨噬细胞在感应阶段的作用是摄取、处理、提呈抗原和调节免疫应答。

(二)反应阶段(response stage)

反应阶段是抗原特异性淋巴细胞的活化、增殖与分化阶段,又称为增殖和分化阶段(proliferative and differentiation stage)。

T 淋巴细胞通过双重识别之后,激活转化为淋巴母细胞,随之母细胞增殖、分化,最终成为具有各种免疫效应的致敏淋巴细胞。在母细胞化过程中,胞体增大,胞浆增多,染色质变疏松,出现明显的核仁,微管和多聚核糖体形成,大分子物质合成与分泌增加。T 细胞在活化、增殖与分化过程中,除产生效应性细胞外,并分泌一系列细胞因子,将免疫应答推向纵深。

B 淋巴细胞受抗原刺激后,与 T_H 细胞相互作用而活化,随之也发生增殖和分化,其中有些转化为浆母细胞,再分化成熟为抗体形成细胞(antibody forming cell, AFC),合成和分泌抗体。抗体形成细胞包括形态各异的浆母细胞和浆细胞。

致敏淋巴细胞与浆细胞是终止细胞,不再分化,寿命短。受抗原刺激后的淋巴细胞,在增殖、分化过程中,一部分细胞在中途停顿下来,不再继续分化,成为记忆细胞而长期存在。

(三)效应阶段(effective stage)

效应阶段是效应细胞和效应分子发挥效应的阶段,或是免疫效应物质与相应的抗原或带抗原的靶细胞结合而发挥免疫效应的阶段。此阶段主要包括免疫应答过程最终产生的致敏淋巴细胞和效应物质,如淋巴因子和抗体等,作用于抗原,产生细胞免疫和体液免疫。

在此阶段中,浆细胞合成并分泌免疫球蛋白,进入体液或组织,与抗原特异性结合,中和毒素,在巨噬细胞或在补体的协同作用下,杀死病原体或破坏抗原,发挥体液免疫效应。而经血流运至抗原所在地的致敏淋巴细胞,当再次接触抗原时,即通过释放淋巴因子直接杀伤靶细胞,破坏和清除抗原,发挥细胞免疫效应。

三、牙髓的免疫应答

牙髓的免疫应答首先表现在对外来抗原刺激的炎症反应。虽然化学、热、机械、电、放

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

射或微生物等刺激均可引起牙髓的炎症反应，但是最常见的还是龋齿和牙菌斑中微生物及其毒素的抗原刺激。

龋洞中的微生物及其代谢产物、毒素等抗原物质所引起的牙髓炎症反应，主要见于与龋洞底部相连的牙本质小管下方的牙髓区域内，这不仅是抗原经小管途径弥散的表现，而且说明与龋病有关的牙髓变化实际发生在细菌入侵之前，当牙本质外层患龋时，牙髓就可能出现反应，当深龋接近修复性牙本质时，牙髓中即可出现慢性炎症。而当细菌侵入牙髓时则可能形成脓肿。检测龋病过程中牙髓组织免疫细胞的变化时发现，在龋病早期主要是T细胞介导的细胞免疫发挥作用，随着龋病的进展，由B细胞介导的体液免疫开始起主要作用。表明人牙髓组织是具有免疫防御功能的组织，在防御外来微生物的入侵以及牙髓炎的发生和发展中起着重要的作用。

牙菌斑的大多数G^+和G^-细菌，都能激活大部分免疫途径，随着细菌积聚的增加，牙菌斑在免疫应答中的作用更为复杂。为了证实牙菌斑成分对牙髓的作用，Bergenholtz曾在新制备的牙本质洞内应用牙菌斑提取物和牙菌斑细菌培养物，10～32h后，在邻近洞底的牙髓组织中有明显的炎症和白细胞聚积。Majave在用牙菌斑进行的猴牙实验中，发现牙菌斑中某些溶解物能引起牙髓炎症变化。这些研究说明牙本质对防止牙髓组织免于有害因素损伤的能力是很有限的。

牙髓炎症常常是龋病发展的结果，免疫学研究认为牙髓的炎症变化与牙髓对抗细菌和某些抗原刺激的免疫应答有关。在变形链球菌引起的大鼠牙髓炎组织中，$CD4^+$的T淋巴细胞表达增高，同时有IL－2、IFN－γ和IL－4的增高。用牙髓坏死组织获取的微生物接种无菌小鼠，发现能诱导细胞因子合成。表明牙髓炎的发生有免疫细胞的参与。

随着龋病的发展，细菌和某些可溶性抗原的刺激，牙髓中可出现典型的炎症变化，除血管扩张，通透性增加，多形核白细胞渗出外，在成牙本质细胞层下方还有淋巴细胞、巨噬细胞、浆细胞浸润。炎症牙髓中的这些细胞皆为免疫细胞，在抗原的持续作用下，它们或增殖、分化为分泌各种免疫球蛋白的抗体形成细胞，或增殖、分化为具有各种免疫效应的致敏淋巴细胞，从而使牙髓出现一系列有关的免疫反应。

（一）体液免疫应答

体液免疫应答是以浆细胞产生抗体并发挥效应功能的免疫应答，因此，又被称为抗体介导的免疫应答（antibody－mediated immunity，AbMI）。

任何部位的免疫现象都是由该部位出现的免疫细胞而体现。许多研究表明，炎症牙髓中有许多抗体形成细胞，产生的抗体有IgG、IgA、IgM和IgE等，这些抗体形成细胞随着炎症的出现而出现，随着炎症的消失而消失，炎症越明显，细胞数越多。无疑，抗体形成细胞或免疫球蛋白在牙髓的炎症反应中起着重要的作用。

抗体是特异性体液免疫的效应分子。抗体的效应活性具有广泛的生物学作用，包括激活补体作用，溶解细胞，凝集颗粒，沉淀可溶性抗原，中和毒素，调理作用，促进吞噬，封闭作用及促进靶细胞与K细胞、巨噬细胞的结合，导致靶细胞的杀伤等。从而，使人牙髓具有防御性或超敏性免疫反应能力。可局部合成抗体的炎症牙髓组织存在明显的抗体介导的体液免疫应答。

但是，牙髓组织在对抗原物质的反应中，其渗出物的引流和牙髓的正常恢复受到牙髓组织所处特殊解剖结构的妨碍。

（二）细胞介导免疫

细胞介导免疫（cell－mediated immunity，CMI）或细胞免疫（cellular immunity，CI），既包括原始的吞噬作用和 K 细胞、NK 细胞介导的细胞毒作用，也包括 T 细胞介导的特异性免疫，或致敏淋巴细胞与特异性抗原的反应。

Perovic 等曾进行研究证实牙髓中存在细胞介导的免疫反应，实验中以完全佛氏佐剂与同种异体牙髓使兔子致敏，然后用异体巨噬细胞混悬液封于下颌切牙牙髓的切端，次日拔除该牙进行组织学检查，结果发现异体巨噬细胞移动受到极大抑制，甚至完全停止。这是致敏 T 淋巴细胞在特异抗原的作用下释放了巨噬细胞移动抑制因子的结果。

T 细胞介导的免疫应答有两种基本形式，一是通过释放淋巴因子引起的单核细胞浸润为主要的炎症反应；另一个是特异性细胞毒作用。因此，不能忽视细胞介导免疫在牙髓病变中的作用。

随着免疫学的发展，发现淋巴细胞在特异性免疫的形成与发展中具有重要作用，是构成细胞免疫和体液免疫的细胞。细胞免疫的概念已超过吞噬细胞吞噬作用的范围。细胞介导免疫主要是指在免疫过程中由致敏 T 细胞及其产生的介质参加的一类免疫应答。吞噬细胞中功能最强的是经 T 细胞淋巴因子激活后的吞噬细胞。因此认为细胞免疫应扩大到非抗体介导的吞噬细胞，凡是体液免疫以外，由淋巴细胞和吞噬细胞所导致的细胞免疫应答，均称为细胞免疫。

由于细胞免疫与体液免疫有交叉关系，实际上不可能把细胞免疫与体液免疫完全分割开来，例如，在启动体液免疫的过程中，必然有细胞的作用，而且抗体在许多方面影响着细胞免疫反应，不可能在完全没有抗体的情况下产生细胞免疫。而且，参与细胞免疫的细胞所产生的介质又可交替地影响着 T 细胞和 B 细胞，因而，应将细胞免疫的概念扩大到以抗体为次要作用的任何细胞的免疫应答。

尽管如此，目前对牙髓中的任何一种免疫应答都还缺乏充足的证据，它们在牙髓尖周病发病中的作用还有待于进一步证实。

（三）牙髓的变态反应

抗体的产生虽可保护牙髓，但相继出现抗原抗体复合物，并引起一系列与多形核白细胞浸润和溶酶体释放有关的反应。由此，组织损伤、血管变化、水肿、牙髓体液容积增加，使疼痛程度随牙髓炎的严重性而加剧，甚至导致血管破坏，组织坏死。因此，免疫病理可能是牙髓炎症时组织破坏的原因。

免疫反应可作为牙髓的防御机制，也可作为组织损害的介导。变态反应是异常的免疫反应。由于牙髓内含有相应的抗原、抗体和一些生物活性成分，牙髓可能出现抗体介导或细胞介导的变态反应。

1．Ⅰ型变态反应

Ⅰ型变态反应是由 IgE 的 FC 段结合在肥大细胞或嗜碱性粒细胞的细胞膜上，再次与抗原结合后促使肥大细胞等胞内颗粒释放介质，引起平滑肌收缩及毛细血管扩张等而发病。Ⅰ型变态反应的全部组分均可在炎症牙髓中出现，如肥大细胞、产生 IgE 的浆细胞及组胺等。文玲英等证实，肥大细胞既存在于炎症牙髓中也存在于正常牙髓中，炎症牙髓的肥大细胞数目明显增多。

在Ⅰ型变态反应中，肥大细胞起着关键作用。然而，人们注意到肥大细胞在慢性炎症

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

中的作用,并定义为迟发反应(later phase reaction, LPR)。尽管对 LPR 发生的详细机制还不十分清楚,但有实验表明 LPR 的发生与肥大细胞颗粒中的介质有着密切关系。肥大细胞具有产生多种细胞因子的特性,并通过其分泌的细胞因子如 TNFα、IL-1 等导致血管通透性增加和淋巴细胞浸润,从而参与 LPR 炎症过程。TNFα 代表着肥大细胞的一种新的介质类型,与目前已知的肥大细胞介质,如组胺类或脂源性介质不同,TNFα 的分泌既有来自胞内预先合成的,亦有刺激后新合成的。因而,肥大细胞很可能在牙髓的慢性炎症中发挥着重要作用,牙髓的Ⅰ型变态反应的表现可能是组织的慢性炎症。

2. Ⅱ型变态反应

Ⅱ型变态反应又称为细胞毒型(cytotoxin type)或细胞溶解型(cytolytic type)变态反应。是指细胞表面抗原或细胞上吸附的半抗原与抗体(主要是 IgG 和 IgM)相结合,或抗原抗体复合物吸附于细胞表面后,通过激活补体引起细胞溶解;被巨噬细胞吞噬裂解;或不需要补体,被非黏连性的 K 细胞杀伤溶解等途径损害靶细胞。被溶解、毒害的细胞主要是血细胞或某些组织的细胞。

炎症牙髓中也含有与细胞毒免疫反应有关的主要成分:牙髓细胞携带着抗原;炎症牙髓内有产生 IgG、IgM 抗体的浆细胞。当它们产生的抗体与表面具有抗原性的细胞接触时,则可能发生细胞溶解现象。用标记的抗血清,有时在炎症牙髓中可以看到补体,说明相应的抗原与抗体结合后激活了补体,从而可招引其他细胞来对其吞噬、消毁或溶解。牙髓炎症时也许存在着Ⅱ型变态反应。

3. Ⅲ型变态反应

Ⅲ型变态反应是由可溶性小分子的抗原抗体复合物引起的,又称为免疫复合物型(immune complex type)或血管炎型的变态反应。其主要特点是细胞外游离的抗原与相应的抗体结合成免疫复合物(immune - complex, IC),在一定条件下,若不能及时清除,此免疫复合物则可沉积于组织,并通过激活补体或其他细胞成分,最后造成以中性粒细胞浸润为主的炎症性病变,此种病变伴有出血、水肿和组织坏死。

Arthus 反应是给已免疫的动物皮内注入同种抗原后,数小时内局部出现水肿、红斑、硬结、坏死等为特征的炎症反应。此反应是Ⅲ型变态反应的典型症状,是由 Arthus(1903)首先发现的,称为 Arthus 反应。Arthus 反应需要三个组成部分:免疫复合物、补体系统和多形核白细胞。其反应过程是通过抗原抗体免疫复合物,激活补体,引起一系列与多形核白细胞浸润和溶酶体释放有关的反应,由此出现血管变化、炎细胞浸润、组织损伤等炎症变化。

某些牙髓炎症是抗原刺激的结果,机体产生的循环抗体又可能导致牙髓的免疫病理变化,牙髓组织可发生以 Arthus 反应为特征的Ⅲ型变态反应。其实验研究有:

Bergenholtz G, Ahlstedt S, Lindhe J(1977)用牛血清白蛋白免疫猴,再于暴露的猴牙牙本质上局部应用该蛋白,观察牙髓中是否有诱导的炎症反应。结果:免疫猴的牙髓对牛血清白蛋白的应用都出现了明显的炎症反应,34 个牙有 26 个牙髓出现了严重或极严重的反应,8 个牙出现了中度反应。牙髓炎症的特征是:靠近窝洞底部牙本质小管的牙髓区域内,血管扩张、充血,组织水肿,血管外组织中有大量多形核白细胞浸润聚集,有的部位形成脓肿,有的出现坏死。与此同时,免疫猴的血清中有高效价的牛血清白蛋白抗体,且主要是 IgG 抗体。可见,这些抗体在介导所观察到的牙髓病变中起了决定性作用,牙髓组织出现的炎症与 Arthus 反应极为相似。

而后，Adamkiewicz VW，Pekovic DD(1980)又用卵白蛋白致敏兔子，直到获得高效价循环抗体和出现 Arthus 皮肤反应后，再用同样的卵白蛋白 0.001mL 在切牙牙髓作局部攻击，于不同时间去除牙髓进行观察。结果：光学显微镜观察到牙髓病变；电子显微镜观察到血管出现渐进性损害，内皮细胞连接破裂，空泡形成；免疫荧光观察到牙髓中有卵白蛋白－抗卵白蛋白免疫复合物的沉淀等，说明牙髓组织出现了 Arthus 反应。

文玲英等用 O 溶血素致敏家兔，获得高效价循环抗体和 Arthus 皮肤反应后，再用同一抗原于牙髓作局部攻击。结果牙髓出现了急性炎症，组织中有免疫复合物，其特异荧光主要位于血管壁。因而，进一步明确了抗原－抗体复合物在牙髓损害中的作用。该实验采用 O 溶血素致敏和攻击，是因为 O 溶血素是溶血性链球菌的一种溶血毒素，属于蛋白质，具有致敏活性，抗原性很强。虽然人体感染链球菌的部位多在扁桃体、上呼吸道、皮肤等，但牙髓和尖周组织也可被感染而激起免疫反应。牙髓感染溶血性链球菌后，不但可能激起其他脏器的变态反应性损害，而且若经牙髓再次接触到同样的细菌毒素后，牙髓局部也可出现病变。

有广泛龋病和获得性免疫的患者，其牙髓内可能出现炎症变化，这种变化是由于先前牙髓连续暴露于抗原后而产生大量特异性抗体的结果。

四、尖周组织的免疫应答

尖周病(periapical diseases)绝大多数由牙髓病而来，而且主要通过牙髓治疗达到治愈，因此称为龋病、牙髓病的继发病。近年，随着口腔疾病免疫学的进展，越来越多证据表明，在尖周组织疾病中，免疫应答起着重要的作用。

免疫应答可以防止疾病，也可以产生疾病，造成组织损害。目前认为，慢性尖周炎是机体对根管系统抗原的病理免疫反应性疾病。尖周组织的破坏是病理性免疫反应的结果。

(一)引起尖周组织免疫病理的抗原物质和免疫成分

1. 根管内的抗原物质：免疫反应必需的成分是抗原，通过根管系统引起尖周组织免疫反应的抗原物质有：

(1)聚集于根管内活的或死亡的口腔细菌和细菌毒素。

(2)感染变性坏死的牙髓组织及其分解产物。

(3)牙髓治疗药物中的半抗原与体内蛋白结合形成的抗原物质。

这些抗原物质不断通过根尖孔进入尖周组织，引起局部或机体的免疫反应。

2. 尖周病变中的免疫成分：免疫反应亦需要有免疫成分参与。尖周病变中的免疫成分有：

(1)尖周病变中存在淋巴细胞、浆细胞、多形核白细胞、巨噬细胞、肥大细胞和嗜酸性粒细胞。这些细胞都是在免疫反应中发挥作用的免疫细胞。

(2)尖周病变中有产生各种免疫球蛋白的浆细胞和补体成分，例如，产生 IgG、IgA、IgM、IgE 的浆细胞，其中产生 IgG 的浆细胞数最多，其次是产生 IgA、IgM、IgE 的浆细胞，且在血管壁及其附近的结缔组织中有 C3 补体成分。

(3)尖周病变中的 T 淋巴细胞及其亚群等。

在尖周病变的免疫成分中，在炎症的不同时期内，淋巴细胞都是其中的主要细胞，约占炎细胞总数的 50%～60%，其中 T 细胞数多于 B 细胞数。而在 T 细胞的两个亚群中，T_H 和

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

T_S 在免疫反应中起着重要的调节作用，又称为调节性 T 细胞。

3．尖周病变中 T_H 和 T_S 的变化有关尖周病免疫病理的资料大多来自人牙慢性尖周炎症的分析，以及对大鼠实验性尖周炎的研究：在大鼠尖周病模型中，病变早期骨破坏显著时，T 细胞亚群中的 T_H 数高于 T_S，T_H/T_S 为 1.70。病变进展减慢时，T_H 与 T_S 的数目接近，T_H/T_S 为 0.9。

由于 T_H 可以活化巨噬细胞，刺激骨吸收因子 IL－1、TNFα 的分泌，促进 B 细胞形成抗体，因此，T_H 的介导功能在病变发展中发挥关键作用。T_S 在病变的慢性期占优势，使之在局部形成一种免疫抑制环境，抑制过强的免疫反应，避免组织损害过大。T_H/T_S 是宿主免疫调节状态的一个指标，T_H/T_S 随病变发展而变化，它们的比值反映了 T 细胞的调节平衡作用，说明尖周病变的免疫应答是高度受控的。研究还发现在尖周病变中，T_H 丰富的区域，IgG 浆细胞数明显增高，T_H 和产生 IgG 的浆细胞是共同对抗原发生反应的。

（二）尖周组织的病理性免疫应答

许多研究证实，尖周病变中含有各类免疫成分。

由于抗原和免疫成分的相互作用，可引起尖周组织的病理性免疫应答，或包括各型变态反应在内的免疫病理反应。尖周病可能是其中的一型或几型的联合。

1．速发型变态反应：速发型变态反应的主要免疫成分是 IgE 和肥大细胞。Mathiesen A（1973），Pulver WH，Tubman MA，Smith DJ（1978），Stern MH，Dreizen S，Mackler BF 等（1982）均证实尖周病变中有产生 IgE 的浆细胞和肥大细胞。Torabinejad M，Kettering JD，Bakland LK（1981）曾用过氧化物酶和抗过氧化物酶检查 27 个尖周病变组织，其中有 20 个有 IgE 浆细胞，占 74%。因此，在尖周病的发病中可能有 IgE 介导的变态反应。当抗原作用于结合在肥大细胞或嗜碱性粒细胞表面的 IgE 抗体后，则可引起细胞脱颗粒，再释放组胺和其他介质，结果发生急性炎症反应，同时发生骨质破坏。

2．细胞毒型变态反应：细胞毒型变态反应或溶细胞性变态反应的主要免疫成分是 IgG、IgM 和补体。Naidro 在根尖肉芽肿内观察到了许多 IgG 细胞，他认为来自根管系统抗原的主要抗体是 IgG。而且，Molmstrom 在尖周病变中也发现许多产生 IgG、IgM、IgA 的浆细胞和 C3 补体。Jones 应用放射性氨基酸（^{14}C 异白氨酸和 ^{14}C 赖氨酸）孵育尖周病变组织，证实有 IgG、IgA 的合成。当两个相邻的 IgG 分子或一个 IgM 分子与作用于细胞表面的相应抗原连接时，在补体的参与下，被激活的补体系统则导致细胞膜的破坏或溶解，从而发生细胞毒型变态反应。

3．免疫复合物型变态反应：免疫复合物型变态反应又称血管炎型变态反应，其典型的局部病变是 Arthus 反应，一般认为这样的组织损害与尖周病的发病有重要关系，主要的免疫成分是各种免疫球蛋白和补体。抗原－抗体免疫复合物是本型变态反应的标志。Torabinejad 已证实人牙尖周病中有免疫复合物。

当抗原－抗体免疫复合物局部沉积后，则激活补体系统，产生 C3a、C5a、C5b 等因子，这些因子对尖周组织中的多形核白细胞有亲和力，或有趋化作用。当免疫复合物均附着于多形核白细胞，或被多形核白细胞吞噬时，释放溶酶体，溶酶体含有前列腺素、组织蛋白酶、激肽酶和降解酶等许多损伤组织的酶；而且多形核白细胞也含巨噬细胞趋化因子，吸引巨噬细胞至病变部位。巨噬细胞除吞噬局部的抗原外，也释放前列腺素、胶原酶、酸性水解酶和在病变发病和修复中起重要作用的细胞因子。因此，除由多形核白细胞释放的物质外，巨

噬细胞释放的细胞因子也能引起尖周组织的破坏。

4. 迟发型变态反应:迟发型变态反应为细胞介导的免疫反应,成为致敏淋巴细胞和特异性抗原的反应。Dietz VH(1952)曾将根管内容物的滤液作为抗原进行皮内试验,结果有40%的尖周病患者出现阳性皮肤反应。Stabholz A, McArthur WP(1978)用坏死牙髓作抗原进行末梢血白细胞游走抑制试验,结果发现尖周病患者的外周血白细胞游走抑制率较对照组有明显增高。说明尖周病患者的外周血白细胞中有抗坏死牙髓抗原的细胞介导免疫反应。但这仅是迟发型超敏反应能够发生在尖周组织病变中的间接证据,并不能代表病变组织的T细胞情况。而Morse, Forber等用扫描电镜观察了尖周损害的细胞组成,发现大多数淋巴细胞是T细胞,同时病变区还有大量的巨噬细胞,认为是迟发型超敏反应在尖周病中起作用的一个迹象。Stern对11例尖周肉芽肿的检测也获得了细胞介导免疫在尖周病中起作用的证据。Farber和Tornek一样,认为尖周组织最常见的反应类型可能是对根管系统抗原物质的迟发型超敏反应,有时也出现Arthus反应。

尽管尖周组织中的免疫反应是作为机体对根管系统中的抗原所产生的一种保护性反应,但邻近组织的损伤是不可避免的。由于根管系统中不断释放抗原的结果,组织的变更更加明显,尖周组织损害亦随之增大。为此特别强调:只有将根管中的抗原物质彻底清除干净,尖周组织的免疫反应才可能终止。因而,进行根管机械预备,彻底地从根管内清除抗原物质,仍然是根管治疗中最重要的处理方法。

(三)尖周组织的炎性细胞和病变类型

酯酶染色又称ANAE染色,可对T淋巴细胞起特异性标记。单核细胞或巨噬细胞、浆细胞、嗜酸性粒细胞等也对酯酶起阳性反应。采用酯酶着色的组织化学方法对根尖肉芽组织肿块的炎性细胞相对分布进行研究,结果:在26例随拔牙牙齿带出并紧紧附丽于根尖的肉芽肿中,浆细胞占优势的14例,T淋巴细胞占优势的12例。前者有大量炎细胞浸润和丰富的毛细血管,浸润的细胞中除大量浆细胞外,并有较多的多形核白细胞及散在的淋巴细胞、巨噬细胞,表现出向急性炎症转化的趋势;后者除较多的T细胞、巨噬细胞、成纤维细胞和胶原纤维外,并有浆细胞、多形核白细胞散在于组织内,表现出向慢性炎症转化的趋势,即在急性炎症转化的病例中浆细胞和多形核白细胞较多;向慢性炎症转化的病例中T淋巴细胞和巨噬细胞较多。由于浆细胞的存在表示抗体的存在,T细胞的存在表示淋巴因子的存在,因而病变中以浆细胞占优势的炎症反应可能是体液免疫反应为主体的炎症反应;以T细胞占优势的炎症反应则可能是以细胞免疫反应为主体的炎症反应,是迟发型超敏反应的表现。

该研究与Jahannessen等的研究结果一致。在尖周组织的炎性细胞与病变类型的关系中,浆细胞和多形核白细胞与有急性炎症趋势的尖周病变密切相关;T细胞和巨噬细胞与有慢性炎症趋势的尖周病变密切相关。在实验性大鼠尖周炎病损中,发现Ⅱ类主要组织相容性复合物MHC表达细胞在尖周炎早期可能起某种作用,树突状细胞在随后的病损稳定阶段中发挥主要的免疫防御功能。通过免疫组化定量研究实验性大鼠尖周病损,发现早期主要是$CD4^+$淋巴细胞,晚期主要是$CD8^+$淋巴细胞和浆细胞发挥作用。近年研究发现,体液免疫在尖周病中发挥着重要的作用,有可能与尖周病损的结局密切相关。以上研究表明尖周组织炎症病变呈动态变化,包含着细胞群的变化或免疫反应类型的变化。

在尖周病组织中,巨噬细胞的出现总是伴随着T细胞而出现,此种分布特征则可能是

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注领取

T细胞趋化作用的结果,同时也表明巨噬细胞在趋化慢性炎症过程中或炎症修复中的作用。

(四)根管渗出液的抗体成分和细胞因子

1. 根管渗出液的抗体成分:根管内的渗出液是尖周组织炎症时通过根管的渗液,富含蛋白质。检测根管渗出液中的免疫球蛋白亦是探讨尖周病免疫病理的途径之一。

文玲英等于1993年检测了50例单根前牙和前磨牙因创伤或因畸形中央尖感染的患牙根管渗出液中的免疫球蛋白,术前X线片显示所有患牙均有尖周稀疏区,其中24例尖周骨质破坏边界整齐,根管渗液呈透明清亮或透明褐色;26例尖周骨质破坏边界弥散,渗出液为血性或脓血性。依据X线片和渗出液的色泽性状分为两组,前者为尖周囊肿,后者为尖周脓肿。结果表明:

(1)所有病例根管渗出液中的IgG含量都较高。

(2)清亮渗液中的IgA含量高于血性渗液。

(3)血性渗液中的IgM含量又高于清亮渗液,而且血性渗液的患牙在临床上多数有十分明显的疼痛、肿胀、松动、叩痛症状,清亮渗液的患牙,多数无明显症状。根管渗液中的IgG、IgA、IgM,应是尖周病变组织中浆细胞的产物,也是尖周病病理过程中体液免疫反应的证据。两类渗液中IgG含量均最多,表明它是尖周病免疫反应的重要物质。清亮渗液中IgA含量较高,表明IgA的分泌与尖周囊肿的形成有关。

血性和脓血性渗出液中IgM含量较高,表明IgM的分泌与尖周脓肿的形成或慢性炎症急性发作有关。IgM是机体或组织受到抗原刺激后,体内首先出现的抗体。因此,在感染的早期,IgM起先锋免疫作用。然而,由于两个相邻的IgG分子或一个IgM分子作用于细胞表面的抗原时,在补体的参与下,可使细胞溶解,组织损伤,因此,在急性炎症的发病中,或慢性炎症急性发作中,IgM亦起了重要作用。

Matsuo(1995)采用酶联免疫吸附(ELISA)检测69例单根牙尖周渗出液中的IgG和IgA含量,并依据尖周X线阴影长度分为两组:大于1cm者为大病变组,小于1cm者为小病变组,其中又以是否有触痛再分为触痛组和无触痛组。结果表明:

(1)根尖渗出液的IgG含量显著高于IgA。

(2)渗液中的IgG量明显高于健康人血清的IgG含量。IgA含量则接近人血清的IgA含量。

(3)渗液中的IgG含量与尖周病变大小和黏膜有无触痛均有关。

许多研究证实,人牙尖周病变中存在免疫活性细胞,如巨噬细胞、T细胞、B细胞、合成免疫球蛋白的浆细胞等。但在尖周病变的免疫活性细胞中,合成免疫球蛋白的细胞是主要的细胞,其中,合成IgG和IgA的细胞又占主要地位,它们确可在病变组织中产生IgG和IgA,说明尖周病变局部的免疫反应是活跃的。

2. 根管渗出液的细胞因子:

(1)白细胞介素-1(IL-1):

IL-1具有广泛的免疫调节、致热和介导炎症的作用。它能增强T细胞的辅助功能,促进各种效应T细胞诱导B细胞的分化和抗体产生,刺激成纤维细胞诱导其产生胶原酶和前列腺素,促进破骨细胞的活性,从而加速骨吸收。因此在尖周病发病过程中的作用逐渐受到人们重视。

岩本等最早在感染根管的渗出液中检测到 IL－1 的存在，并且发现与临床症状有显著的相关性。谷信等用感染根管中细菌的粉碎菌体上清液检测其诱导 IL－1 的性能，结果表明，G^- 厌氧菌 IL－1 诱导活性最高，而细菌外毒素几乎没有诱导活性。细菌刺激尖周组织中的巨噬细胞产生 IL－1，从而使浸润的 T、B 细胞活化，激活尖周组织的免疫反应，诱导尖周病变产生。

用 ELISA 方法检测感染根管渗出液中的 IL－1α 和 IL－1β，结果：IL－1α 的浓度与尖周稀疏区大小有关，尖周阴影在 1.0 cm 以下者较 1.0 cm 以上者高，有脓液者较无脓液者高；IL－1β 的浓度与临床表现无明显关系，而且高于 IL－1α 的浓度；在尖周囊肿的根管治疗术过程中，IL－1β 的浓度随渗出液的减少而减少，IL－1α 则有随渗出液的减少而增高的趋势。

用逆转录聚合酶链反应（RT－PCR）进行检测，结果：急性期病例的 IL－1β 的基因表达较慢性期为强；急性期病例中的 IL－1β 表达又较 IL－1α 为强。说明作为破骨细胞活化因子之一的 IL－1β，具有促进牙槽骨吸收和损伤组织的作用。因而，尖周炎症有无活动，根据这种因子活性的强弱便能了解。

（2）白细胞介素－6（IL－6）：

IL－6 作为一种重要的炎症介质，与炎症性疾病有密切关系。目前已越来越被人们所重视，许多学者对其在牙龈炎、牙周炎组织中的表达及在这些炎症中的作用已作了充分肯定。采用 ELISA 免疫组织化学方法，检测牙髓、尖周炎症组织渗出液中 IL－6 含量和炎症牙髓组织中 IL－6 的表达。结果炎症牙髓和炎症尖周组织的渗液中都有 IL－6，急性炎症期的含量较高，急性尖周炎高于急性牙髓炎；炎症牙髓组织中的 IL－6 表达阳性，主要阳性表达细胞为单核－巨噬细胞、成纤维细胞和少量血管内皮细胞。因而说明 IL－6 与牙髓、尖周组织的局部炎症密切相关，在牙髓、尖周组织炎症中 IL－6 主要参与急性期炎症反应，它的分泌和表达与炎症状态下炎细胞的渗出、炎性介质的存在有关。

（3）肿瘤坏死因子（TNF）：

TNF 也是炎症中的一种重要细胞因子，除具有杀伤或抑制肿瘤细胞的功能外，还能增强机体的局部炎症反应，刺激单核－巨噬细胞分泌的 IL－1，并调节 MHC－Ⅱ类抗原的表达。PCR 检测表明感染根管渗出液中有较强的 TNF 基因表达，表明 TNF 是尖周病变中细胞因子网络的重要成员之一。

IL－1、IL－6 和 TNF 有许多相同的生物学作用，它们之间的相互作用直接与炎症病变的形成有关。

（五）尖周病变中的破骨细胞

尖周病变中的破骨细胞是骨吸收的主要作用者。目前认为破骨细胞的形成和活化受多种因素影响，其骨吸收作用依赖于成骨细胞的存在。Mcsheehy PM，Chambers TJ（1987）研究表明：成骨细胞介导的破骨作用不是通过改变骨基质来实现，而是释放一些可溶性物质，刺激破骨细胞性骨吸收。Boyed 指出硬组织形成细胞对破骨细胞的作用主要是阻止或允许破骨细胞与硬组织接触。因此，任何影响硬组织形成细胞功能的因子，都将影响到破骨作用。Horton 曾提出破骨细胞活化因子（OAF）的作用，实际上是作为 OAF 的主要成员的 IL－1、IL－6 和 TNF 等的作用，这些细胞因子都具有刺激骨吸收的能力。Thomson BM，Mundy GR，Chambers TJ 等（1987）认为，TNF 和 IL－1 并不直接作用于破骨细胞，而是作用于成骨细胞，再由成骨细胞介导破骨细胞性骨吸收。破骨细胞的形成需要活的骨形成细胞存在。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

因 OAF 的主要成员都是巨噬细胞源性的细胞因子，广泛分布于尖周病变组织中的巨噬细胞与尖周骨质破坏关系密切。

总之，在尖周组织的免疫病理反应中，有包括巨噬细胞在内的各类免疫细胞、免疫球蛋白、T 细胞亚群以及与组织损害和修复有关的多种细胞因子的参与。

（文玲英，汪平）

参考文献

1. Dietz VH. Intracutaneous tests using filtrates prepared from pathologic pulps of human teeth, with special reference to rheumatoid arthritis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1952 Aug;5(8):877
2. Balk SD. Stimulation of the proliferation of chicken fibroblasts by folic acid or a serum factor(s) in a plasma – containing medium. Proc Natl Acad Sci U S A. 1971 Aug;68(8):1689
3. Nishida O, Okada H, Kawagoe K, et al. Investigation of homologous antibodies to an extract of rabbit dental pulp. Arch Oral Biol. 1971 Jul;16(7):733
4. Mathiesen A. Preservation and demonstration of mast cells in human apical granulomas and radicular cysts. Scand J Dent Res. 1973;81(3):218
5. Gospodarowicz D, Moran J. Effect of a fibroblast growth factor, insulin, dexamethasone, and serum on the morphology of BALB/c 3T3 cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1974 Dec;71(12):4648
6. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, et al. An endotoxin – induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1975 Sep;72(9):3666
7. Bergenholtz G, Ahlstedt S, Lindhe J. Experimental pulpitis in immunized monkeys. Scand J Dent Res. 1977 Sep;85(6):396
8. Stabholz A, McArthur WP. Cellular immune response of patients with periapical pathosis to necrotic dental pulp antigens determined by release of LIF. J Endod. 1978 Sep;4(9):282
9. de Larco JE, Todaro GJ. Epithelioid and fibroblastic rat kidney cell clones: epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation. J Cell Physiol. 1978 Mar;94(3):335
10. Pulver WH, Taubman MA, Smith DJ. Immune components in human dental periapical lesions. Arch Oral Biol. 1978;23(6):435
11. Carpenter G. Epidermal growth factor Ann Rev Biochem. 1979;48:193
12. Adamkiewicz VW, Pekovic DD. Experimental pulpal Arthus allergy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1980 Nov;50(5):450
13. Torabinejad M, Kettering JD, Bakland LK. Localization of IgE immunoglobulin in human dental periapical lesions by the peroxidase – antiperoxidase method. Arch Oral Biol. 1981;26(8):677
14. Urist MR, Lietze A, Mizutani H, et al. A bovine low molecular weight bone morphogenetic protein(BMP) fraction. Clir Orthop. 1982;162:219
15. Stern MH, Dreizen S, Mackler BF, et al Isolation and characterization of inflammatory cells from the human periapical granuloma. J Dent Res. 1982 Dec;61(12):1408
16. Pinero GJ, Kiatpongsah S, Hutchins MO, et al. The effect of endotoxin on the synthesis of connective tissue matrix components by pulp fibroblasts in vitro. J Endod. 1983 Jan;9(1):2
17. 文玲英、李伟英、李益民．炎症牙髓的抗体产生细胞．华西口腔医学杂志．1984; 2(4):214
18. Van Furth R. Disselhffder DMMC Dual origin of mouse spleen macrophages . J Exp Med. 1984;160:1273
19. 文玲英综述．牙髓尖周病免疫学．国外医学 口腔医学分册，1984;6:324
20. Boyed A, Ali NN, Jones ST. Resorption of dentine by isolated osteocla sts in vitro. Br Dent J. 1984;156:216

21. Mantesano R, Orci L, Vassalli P. Human endothelial cell cultures: phenotypic modulation by leukocyte Interleukins. J Cell Physiol. 1985;122(3):424

22. Pober JS, Gimbrone MA, Lapierr LA, et al. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by IL-1, TNF and IFN. J Immunol.1985;137(6):1893

23. Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, et al. Identity of tumor necrosis factor and macrophage - secretar cachection. Nature. 1985;316:552

24. Bowen - Pope DF, Ross R, Mcthods for studying the platelet - derived growth factor receptor. Methords Enzymol. 1985;109:69

25. Kasselberg AG, Drth DN, Gray ME, et al. Immunocytochemical location of human epidermal growth factor/urogastrone in several human tissues.J Histochem Cytoch em. 1985;33:315

26. Montesano R, Orci L, Vassalli P. Human endothelial cell cultures: phenotypic modulation by leukocyte interleukins. J Cell Physiol. 1985 Mar;122(3):424

27. 文玲英、李益民. 实验性牙髓感染的致敏影响. 中华口腔医学杂志. 1986;21(6) :375

28. 边棣综述. 肥大细胞在免疫和炎症中的作用及药物对其影响. 国外医学　免疫学分册. 1986; 2: 78

29. 文玲英、潘苏、孙庆妹. 实验性牙髓 Arthus 炎症反应. 华西口腔医学杂志.1986; 4(4):253

30. Stophen AH, Guinan EC, Walter F, et al. Recombinant tomor necrosis factor and immume interferon act singly and combination to recognize human vascular endothelial cell monolayers. Am J Pathol. 1986;123(1): 16

31. Pober JS, Berilacqua MP, Mendick DL, et al. Two distinct monokines, IL-1 and TNF, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. J Immunol. 1986;136(5): 1680

32. Klebanoff ST, Vodas MA, Harlar JM, et al. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. J Immunol. 1986;136:4220

33. THomson BM, Saklatvala J, Chambels TJ. Osteoclasts mediate interleuki n - 1 stimulation of bone resoption by rat osteoclast. J Exp Med. 1986;164:104

34. Shinoda S, Murayama Y, Okada H. Immunopathological role of pulpal tissue components in periapical pathosis. II. Specificities of antigenic determinants on modified serum albumins. J Endod. 1986 Nov;12(11):528

35. Stolpen AH, Guinan EC, Fiers W, et al. Recombinant tumor necrosis factor and immune interferon act singly and in combination to reorganize human vascular endothelial cell monolayers. Am J Pathol. 1986 Apr;123(1):16

36. Harlan JM, Thompson PJ, Ross RR, et al. Alpha - thrombin induces release of platelet - derived growth factor - like molecule(s) by cultured human endothelial cells. J Cell Biol. 1986 Sep;103(3):1129

37. Buckley A, Davidson JM, Kamerath CD, et al. Epidermal growth factor increases granulation tissue formation dose dependently. J Surg Res.1987;43:322

38. Jontell M, Bergenholtz G. Immunocompetent cells in the normal dental pulp. J Dent Res. 1987;66:1149

39. Schroedr JM, Mrowietz U, Morita E, et al. Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte - derived, neutrophil - activating peptide that lacks interleukin 1 activity. J Immunol. 1987;139: 3474

40. Bussolino F, Canmussi G, Aglietta M, et al. Human endothelial cells are target for platelet activating factor. J Immunol. 1987;139(7):2439

41. Messadi DV, Pober JS, Fiers W, et al. Induction of an activation antigen on postcapillary venular endothelium in human skin organ culture. J Immunol. 1987; 139(5):1557

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

42. Trecey KJ, Fong Y, Hesse OG, et al. Anti – cachetin TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteremia. Nature. 1987;330:662

43. Thomson BM, Mundy GR, Chambers TJ. Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. J Immunol. 1987 Feb 1;138(3):775

44. Pessa ME, Bland KI, Copeland EM. Ⅲ Growth factors and determinants of wound repair. J Surg Res. 1987; 42:207

45. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor – beta. J Cell Biol.1987;105(9):1039

46. Sampath TK, Muthukumaran N, Reddi AH. Isolation of osteoginin, an extracellular matrix – associated, bone – induction protein, by heparin affinity chromatography. Proc Nati Acad Sci USA. 1987;84:7109

47. Brian M, THomson G, Gregory R. Tumor necrosis factors A and B induce osteoblast cells to stimulates osteoclasts bone resorption. J Immun. 1987;138:175

48. McSheehy PM, Chambers TJ. 1,25 – Dihydroxyvitamin D3 stimulates rat osteoblastic cells to release a soluble factor that increases osteoclastic bone resorption. J Clin Invest. 1987 Aug;80(2):425

49. Akagawa KS. Effects of granulocyte – macrophage colony – stimulating factor and colonystimulating factor – 1 on the proliferation and defferentiation of murine alvcolar macrophages. J Immunol. 1988;141:3844

50. Jontoll M, Bergenholtz G, Schcynius A, et al. Dendritic cells and macrophages expressing class Ⅱ antigens in the normal rat incisor pulp. J Dent Res. 1988;67: 1263

51. Bussolino F, Camussi G, Baglioni C. Synthesis and release of platelet factor by human vascular endothelial cells treated with TNF or IL – 1α. J Biol Chem. 1988;2 63(24):11856

52. Lapierre LA, Fiers W, Pober JS. Three distinct classes of regulatory cytokines control endothelial cell MHC antigen expression. J Exp Med. 1988;167(3):794

53. Cers Heyden, Aarde. Il – 6 in serum and wrine of renal transplant recipiets. Clin Exp Immund. 1988;71: 314

54. Matsushima K. Molecular cloning of a human monocyte – derived neutrophil chemotactic factor(MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. J Exp Med. 1988;167:1883

55. Samsel RW, Nelson DP, Sanders WM, et al. Effect of endotoxin on systemic and skeletal muscle O2 extraction. J Apple physiol. 1988;65:1377

56. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science. 1988;242:1528

57. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science. 1988 Dec 16;242(4885):1528

58. 文玲英、马福成. 人牙髓中的肥大细胞. 实用口腔医学杂志. 1989;5(2):108

59. Alberto M, Elisabetta D. Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. Immunology Today. 1989;10(11):370

60. Braquet P, Paubert BM, Koltal M, et al. Is there a case for PAF antagouists in the treatment of ischemic states? Trends Pharmacol Sci.1989;10(1):23

61. D'souza R, Brown LR, Newland JR, et al. Detection and characterization of interleukin – 1 in human dental pulps. Arch Oral Biol. 1989;34(5):307

62. Marti V, Burwen SJ, Jones AL. Biology effects of EGF, with emphasis on the gastrointestinal tract and live, and update. Hepatology. 1989;9(1):126

63. Alberto M, Elisabetta D. Cytokines as communication signals between leukocytes and endotheial cells. Immunology Today. 1989;10(11):370

64. Stashenko P, Yu.SM. T helper and T suppresser cell reversal during th e development of induced rat periapical lesions. J Dent Res. 1989;68:830

65. D'Souza R, Brown LR, Newland JR, et al. Detection and characterization of interleukin－1 in human dental pulps. Arch Oral Biol. 1989;34(5):307

66. Steenfos HH, Hunt TK, Scheuenstuhl H, et al. Selective effects of tumor necrosis factor－alpha on wound healing in rats. Surgery. 1989 Aug;106(2):171－5; discussion 175

67. Luyten FP, Cunningham NS, Ma S, et al. Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. J Biol Chem. 1989 Aug 15;264(23):13377

68. 薛毅、史俊南、文玲英．甲醛甲酚合剂实验免疫学研究，甲醛甲酚合剂半抗原性质分析．实用口腔医学杂志．1990;6(增刊):251, 245

69. Wright SD, Romos RA, Tobias PS, et al. CD14: a receptor for compleces of lipopolysaccharide(LPS) and binding protein. Science.1990;249:1431

70. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, et al. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. Science. 1990;249:1439

71. Carlos TM, Schwartz BR, Kovach NL, et al. Vascular cell adhesion molecule－1 mediated lymphocyte adherence to cytokine－activated cultured human endothelial cells. Blood. 1990;76(6):965

72. Pober JS, John D, Christro pher CW, et al. The potential role of vascular endothelium in immune reactions. Human Immunology. 1990;28:258

73. Ferrecro E, Hsich C－L, Franckell, et al. CD_{14} is a member of the family of leucine－rich proteins and is encoded by a gene syntenic with multiple receptor genes. J Immunol. 1990;145:331

74. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. J Biol Chem. 1990;265: 7709

75. Nanney LB. Epidermal and dernal effects of epidermal grwth factor during wound repair. J Invest Dermator. 1990;94:624

76. Liang RF, Nishimura S, Maruyama S, et al. Effects of transforming growth factor－ β and epidermal growth factor on clanal rat pulp cells. Arch Oral Biol. 1990;35(1):7

77. Cam Y, Neumann MR, Ruch JV, et al. Immunolocalization of TGF－β1 and EGF epitopes in mouse incisors and molars with a demonstration of in vitro production of transforming activity. Arch Oral Biol. 1990;35(10):813

78. D'souza RN, Happomen RP, Flanders KC, et al. Histochemical localization of transforming growth factor－betal in developing rat molars using antibodies to diferent epitopes. J Biol Buccale, 1990;18(4):299

79. Nakashima M. The induction of reparative dentine in the amputated dental pulp of dog by bone morphogenetic protein. Arch Oral Biol. 1990;35(7):349

80. Vukicevic S, Paralkar VM, Cunningham NS, et al. Autoradiographic localiation of osteogenin binding sites in cartilage and bone during rat embryonic development . Dev Biol. 1990;40:209

81. Pober JS, John D, Christro phen CW, et al. The potential role of vascular endothelium in immune reactions. Human Immunology. 1990;28:258

82. 文玲英、马福成．尖周肉芽肿的酯酶阳性炎症细胞．实用口腔医学杂志．1990; 6(增刊):220

83. Philip stashenk. THe role of immune cytokines in the pathogenes of periapical lesions. Endod Dent. Iraumatol. 1990;6:896

84. D'Souza RN, Happonen RP, Flanders KC, et al. Histochemical localization of transforming growth factor－beta 1 in developing rat molars using antibodies to different epitopes. J Biol Buccale. 1990 Dec;18(4):299

85. Nakashima M. The induction of reparative dentine in the amputated dental pulp of the dog by bone morphogenetic protein. Arch Oral Biol. 1990;35(7):493

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

86. Vukicevic S, Paralkar VM, Cunningham NS, et al. Autoradiographic localization of osteogenin binding sites in cartilage and bone during rat embryonic development. Dev Biol. 1990 Jul;140(1):209
87. 林万明主编. 医学分子微生物学进展. 第1集上、下册. 北京：中国科学技术出版社. 1991,1993
88. 阎玉梅、陆德源主编. 现代微生物学. 第1版. 上海：上海医科大学出版社.1991
89. Camussi G, Albano E, Tettae et al. The molecular action of tumor necrosis factor - α. Eur J Biochem. 1991; 202:32
90. 吴其夏主编. 体液因素和血液循环病理生理学. 北京：北京医科大学.中国协和医科大学联合出版社. 1991
91. Jontell M, Jiang W, Bergenholtz G. Ontogenety of class Ⅱ antigen expressing cells in rat incisor pulp. Scand J Dent Res. 1991;99:384
92. Bergenholtz G, Nagaoka S, Jontell M. Class Ⅱ antigen expressing cells in experimentally induced pulpitis. Int Endod J. 1991;24:8
93. Okiji T, Morita I, Sunada I, et al. The role of leukotriene B4 in neutrophil infiltration in experimentally - induced inflammation of rat tooth pulp. J Dent Res. 1991;70(1):34
94. 傅小兵、生长因子与创伤修复. 第1版. 北京:人民军医出版社. 1991年
95. Bartold PM, Haynes DR. Interleukin - 6 production by human gingival fibroblasts. J Periodont Res. 1991; 26:339
96. Camussi G, Albano E, Tettal et al. The molecular action of tumor necrosis factor - α. Eur J Biochem. 1991; 202:32
97. Vaahtokari A, Vainoio S, Thesleff I. Associations between transforming growth factor beta 1 RNA expression and epithelial mesenchymal interactions during tooth morphogenesis. Development, 1991;113(3):985
98. Reddi AH, Cuningham NS. Recent progress in bone induction by osteoge nin and bone morphogenetic proteins: chanllenges for bionmechanical and tissue entineering. J Biomech Eng. 1991;113:189
99. Jacoby BH, Davis WL, Craig KR, et al. An ultrastructural and immunohistochemical study of human dental pulp: identification of Weibel - Palade bodies and von Willebrand factor in pulp endothelial cells. J Endod. 1991;17(4):150
100. Mangkornkarn C, Steiner JC, Bohman R, et al. Flow cytometric analysis of human dental pulp tissue. J Endod. 1991 Feb;17(2):49
101. Jacoby BH, Davis WL, Craig KR, et al. An ultrastructural and immunohistochemical study of human dental pulp: identification of Weibel - Palade bodies and von Willebrand factor in pulp endothelial cells. J Endod. 1991 Apr;17(4):150
102. 李君瓔、黄惟让主编. 免疫生物学概论. 第1版. 北京：北京教育出版社.1992
103. 蔺俊. 口腔厌氧菌内毒素的化学分析、生物学活性对细胞因子的诱生作用及其相关致病学研究. 西安：第四军医大学博士学位论文.1992
104. 张郁. 口腔厌氧菌内毒素对人牙髓、牙周膜成纤维细胞和骨细胞的生物学效应及其相关临床研究. 西安：第四军医大学博士学位论文. 1992
105. Okiji T, Kawashima N, Kosaka T, et al. An immunohistochemical study of the distribution of immunocompetent cells. Especially macrophages and Ia antigen expressing cells of heterogeneous populations, in normal rat molar pulp. J Dent Res. 1992; 71:1196
106. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. Scientific American.1992 ;267(2):26
107. Silva AT, Cohen J. Role of interferon - γ in experimental gram - negative sepsis. J Infect Dis. 1992;166(2):331
108. Wright SD, Ramos RA, Pater M, et al. A factor in plasma that opsonizes lipopolysaccharide - bearing parti-

cles for recognizing by CD14 on phagecytes. J Exp Med, 1992.176:716
109. 吴海珍、文玲英、王泊云. 正常和炎症牙髓中 HLA－Ⅱ类抗原表达细胞的免疫组化研究. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1992;2(1):23
110. 侯鲁虹综述. α－肿瘤坏死因子. 国外医学 创伤与外科基本问题分册. 1992;13 (3):143
111. Harrison DG, Micheal AK, James EQ, et al. Normal and pathophisilogic considerations of endothelial regulation of vasculartone and their relevance to nitrate therapy. Am J Cardiol. 1992;70(8):11B
112. Jontell M, Bergenholtz G. Accessory cells in the immune defense of the dental pulp. Proc Finn Dent Soc. 1992;88 Suppl 1:344
113. Fried K, Risling M, Edwall L, Olgart L. Immuno－electron－microscopic localization of laminin and collagen type IV in normal and denervated tooth pulp of the cat. Cell Tissue Res. 1992; 270(1):157
114. 李君瓔、黄惟让. 免疫生物学概论. 第 1 版. 北京：高等教育出版社. 1992 年
115. Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K. Detection of inflammation cytokine messenger RNA(mRNA)－expressin cells in human inflamed gingiva by combined in situ hydridizati on and immunohistochemistry, Immunology. 1992;76:42
116. 荫俊. 牙髓拟杆菌 ATCC 35406 内毒素脂多糖对肿瘤坏死因子(TNF)的诱导活性. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1992;2(1):15
117. Pugin J, Schurer－Maly CC, Letureg D, et al. Lipopolysaccharide(LPS) activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by LPS binding protein and soluble CD_{14}, Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 90:2744
118. 金岩综述. 牙齿和骨形成蛋白(BMP)的关系. 国外医学 口腔医学分册. 1992; 19(6):342
119. Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, et al. Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to poly peptide growth factor in vitro. J Periodontol. 1992;63:515
120. 傅小兵、田惠民综述. 生长因子调控组织修复的机理. 国外医学 创伤与外科基本问题分册. 1992;13(3):15
121. 周迁中. 多肽生长因子(基础与临床). 第 1 版. 北京:中国科学技术出版社出版. 1992:75
122. 侯军综述. β转化生长因子的生物学功能. 国外医学 口腔医学分册. 1992;19 (6):350
123. Jepsen S, Schiltz P, Strog DD, et al. Transforming growth factor－ α1 mRNA in neonatal ovine molars visualized by in situ hybridization potential role for the stratum intermedium. Archs Oral Biol. 1992;37(8):645
124. Nakashima M. The effect of growth factors on DNA synthesis. proteo glycan synthesis and alkaline phosphatose activity in bovine dental pulp cells. Arch Oral Biol. 1992;37(3):231
125. Takashi Matsuo, Shigeyuki Ebisu, Yoshio shimabukllyo, et al. Quantitat ive analysis of immuno－compentent cells in human periapical lesions: correlations with clinical findings of the involved teeth. Jounal of Endodontics. 1992;18:497
126. Fajardo LF, Kwan HH, Kowalski J, et al. Dual role of tumor necrosis factor－alpha in angiogenesis. Am J Pathol. 1992 Mar;140(3):539
127. Jepsen S, Schiltz P, Strong DD, et al. Transforming growth factor－beta 1 mRNA in neonatal ovine molars visualized by in situ hybridization: potential role for the stratum intermedium. Arch Oral Biol. 1992 Aug;37 (8):645
128. Nakashima M. The effects of growth factors on DNA synthesis, proteoglycan synthesis and alkaline phosphatase activity in bovine dental pulp cells. Arch Oral Biol. 1992 Mar;37(3):231
129. 费哲内综述. 肽生长因子和伤口愈合. 国外医学 创伤与外科基本问题分册. 1992 ;13(3):175
130. Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, et al. Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. J Periodontol. 1992 Jun;63(6):515

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

131. 吴敏毓、刘恭植主编．医学免疫学．第1版．合肥：中国科技大学出版社.1993

132. 雷祚荣主编．细菌毒素分子生物学．第1版．北京：中国科学技术出版社.1993

133. Meghji S, Henderson B, Bamdo Y, et al. Interleukin－1: the principal osteolytic cytokine produced by keratocysts. Archs Oral Biol. 1993;37(11):935

134. Pugin J, Schurer－Maly CC, Letureq D, et al. Lipopolysaccharide(LPS) activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by LPS binding protein and soluble CD14. Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90:2744

135. Kirkland TN, Finley F, Leturcq D, et al. Analysis of lipoplysaccharide binding by CD14. J Biol Chem. 1993;268:4818

136. 吴海珍、文玲英、王泊云．用免疫组化法对正常和炎症牙髓中免疫细胞的研究．牙体牙髓牙周病学杂志．1993;3(3):154

137. 吴海珍、文玲英．用免疫组化法对正常、炎症牙髓中内皮细胞和 Von Willebrand 因子的研究．牙体牙髓牙周病学杂志．1993;3(3):158

138. 程违、李春德主编．免疫生理学．第1版．上海：上海科技出版社．1993年

139. Bando Y, Henderson B, Meghji S, et al. Immunocytochemical localization of inflammatory cytokines and vascular adhesion receptors in radicular cysts. J Oral Pathol Med. 1993;22:221

140. 秦军志综述．肿瘤坏死因子在创伤愈合过程中的调节作用．国外医学　口腔医学分册．1993;20(6):339

141. Kirkland TN, Finley F, Letureg D, et al. Analysis of Lipoplysaccharide binding by CD_{14}. J Biol Chem. 1993;268:4818

142. Zieqler－Heitrock HWL, Vlevith RJ. CD_{14}: cell surface receptor and differentiation marker. Immunol Today. 1993;14:121

143. 李永林综述．上皮生长因子和创面愈合研究进展．国外医学　创伤与外科基本问题分册．1993; 14(3):15

144. 朱旭东、张艳．转化生长因子－β与软组织伤口愈合．生理科学进展．1993;14(4):193

145. 杨连甲、金岩、胡蕴玉主编．口腔和骨科的生物活性材料．第1版．西安：陕西省科学技术出版社．1993

146. Yang Lianjia, Gao Yuhao. Bovine bone morphogenetic protein－ induced dentinogenesis. clinical Orthophaedies and Related Research. 1993;295:305

147. Heyeraas KJ, Kvinnsland I, Byers MR, et al. Nerve fibers immunoreactive to protein gene product 9.5, calcitonin gene－related peptide, substance P, and neuropeptide Y in the dental pulp, periodontal ligament, and gingiva in cats. Acta Odontol Scand.1993;51(4):207

148. Tabas JA, Hahn GV, Cohen RB, et al. Chromosomal assignment of the human gene for bone morphogenetic protein 4. Clin Orthop Relat Res. 1993 Aug;(293):310

149. 文玲英、魏建勤．尖周病患牙根管内渗液的免疫球蛋白．牙体牙髓牙周病学杂志．1993;3(1): 38

150. Han J, Mathison J, Ulevitch, et al. LPS binding protein, truncated at ILe－197, binds LPS but does not transfer LPS to CD14. J Biol Chem.1994;268:8172

151. Baumann H, Gauldic J. Acute phase response. Immunol Today. 1994;15:74

152. Jontell M, Eklof C, Dahlgren UI, et al. Difference in capacity between macrophages and dendritic cells from rat incisor pulp to provide accessory signals to concanavalin－A－stimulated T－lymphocytes. J Dent Res. 1994;73(5):1056

153. Takahashi K, Takashiba S, Nagai A, et al. Assessment of interleuk in－6 in the pathogenesis of periodontal disease. J Periodontal. 1994;65:147

154. Yamazaki K, Nakajima T, Gemmell I, et al. IL－4 and Il－6－producing cells in human periodontal disease tissue. J Oral Pothol Med. 1994;23:347

155. Bloms, Holmstrup P, Dabelsteen E. A comparison of the effect of epidermal growth factor, platelet－derived growth factor, and fibroblast growth factor on rat periodontal ligament fibroblast－like cell's DNA synthesis and morphology. J Por iodontal. 1994;65:373

156. Shirakawa M, Shiba H, Nakanishi K, et al. Transforming growth factor－beta－1 reduces alkaline phosphatase mRNA and activity and stimulates cell proliferation in cultures of human pulp cells. J Dent Res. 1994;73(9):1509

157. Be'gue－Kim C, Smith AJ, Leriot M, et al. Comparative analsysis of TGF－beta1, BMPs, IGF, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene experesion during normal and in vitro induced odontoblast diferentiatin. Int J Dev Biol. 1994;38(3): 405

158. Smith AJ, Tobias RS, Cassidy N, et al. Odontoblast stimulation inferr ets by dentine matrix components. Archs Oral Biol. 1994;39(1):13

159. Masafumi K, Kensella JL. Reorganization endothelial cordlike structures on basement membrane comples: involvement of TGF－β1. J Cell Physiology. 1994;161:267

160. Tziafas D. Mechanisms controlling secondary initiation of dentiongenesis. a review. Int Endo J..1994;27:61

161. Nakashima M. Induction of dention formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins(BMP)－2 and －4. J Dent Res. 1994;73:1515

162. Vakicevic S, Helder MN, Luyten FP. Developing human lung and kidney are major sites for synthesis of bone morphogenetic protein－3(Osteogenin). J Histoche C ytoche. 1994;42:869

163. 郝建军综述．成纤维细胞生长因子家族的研究进展．牙体牙髓牙周病学杂志.1994;4(2):111

164. SΦren Blom, Palle holmstrup, Erik dabelsteen: A comparison of the efect of epidermal growth factor, platelet－derived growth factor and fibroblast growth factor on rat periodontal ligament fibroblast－like cell's DNA synthesis and morphology. J peridontal. 1994;65:373

165. Frenz DA, Liu W, Wiliams JD, et al. Induction of chronogenesis: requirement for synergistic interaction of fibroblast growth factor and transforming growth fac tor－beta. Development. 1994;120:145

166. Akamine A, Anan H, Hamachi T, et al. A histochemical study of the be havior of MΦ during experiment apical peridontitis in rat. Joural of Endod. 1994;20:474－480

167. Akamine A, Hashiguch I, Toriya T, et al. Immuno－histochemical examination on the localization of MΦ and plasma cells in induced rat periapical lesions. En dod Dent Traumatol. 1994;10:121

168. Takashi Okiji, Nobayuki Kawashima, Toshihiko Kosaka, et al.Distributi on of Ia antigen－expressing nonlymphoid cells in varions stages of induced periapical lesions in rat molars. Journal of Endod.1994;20:27

169. Vukicevic S, Helder MN, Luyten FP. Developing human lung and kidney are major sites for synthesis of bone morphogenetic protein－3 (osteogenin). J Histochem Cytochem. 1994 Jul;42(7):869

170. Blom S, Holmstrup P, Dabelsteen E. A comparison of the effect of epidermal growth factor, platelet－derived growth factor, and fibroblast growth factor on rat periodontal ligament fibroblast－like cells' DNA synthesis and morphology. J Periodontol. 1994 May;65(5):373

171. 刘正主编．口腔微生物学．第1版．南京：南京出版社．1995

172. Yoshida T, Nakata K, et al. Effects of lipopolysaccharides on human dental pulp cells. J Endod. 1995;21(3):128

173. 金伯泉主编．细胞和分子免疫学．第1版．西安：世界图书出版公司．1995

174. 张亮林综述．肥大细胞的分子生物学及其生物学效应新进展．国外医学　免疫学分册．1995;

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

4:200
175. 杨宗城、高建川. 血管内皮细胞在烧伤脏器损害发病中的作用. 中华整形烧伤外科杂志. 1995; 11(3):225
176. Sawada T, Nanci A. Spatial distribution of enamel proteins and fibronectin at early stages of rat incisor tooth formation. Arch Oral Biol. 1995;40(11):1029
177. Tziafas D, Panagiotakopoulos N, Komnenou A. Immunolocalization of fibronectin during the early response of dog dental pulp to demineralized dentine or calcium hydroxide – containing cement. Arch Oral Biol. 1995; 40(1):23
178. Vlevitch RJ, Tobias PS. Receptor – depentent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. Annu Rev Immunol. 1995;13:437
179. 张大青、周萍、李叶群等. EGF对火器伤愈合的初步研究. 中华创伤杂志.1995; 11(3):151
180. Dimitrios T. Basic mechanism of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. Int J Dev Biol. 1995;39(2):281
181. Gonal B, Erdogan D. Effect of EGF dosage ferms on alkal iburned corneal wound healing of mice. Burns. 1995;21:7
182. Ruch JV, Lesot H, Begue – kirn C. Odontoblast differentiation. Int J Dev Biol. 1995;39:51
183. Dimitriors Tziafas. Basic mechanisms of cytodifferentition and dentinogenesis during dental pulp repair. Int J Dev Biol. 1995;39:281
184. Smith AJ, Cassidy N, Perry H, et al. Reactionary dentinogenesis. Int J Dev Biol, 1995;39:273
185. Nakansishi T, Matsuo T, Enidu S. Quantitative analysis of immunoglobulins and inflammatory factors in human pulpal blood from exposed pulp. J Endodon. 1995; 21(3):131
186. 高玉好综述. 骨形成蛋白和牙本质形成. 国外医学 口腔医学分册. 1995;22(3):158
187. 丁焕文、何炀煌. 碱性成纤维细胞生长因子的生物学功能. 中华创伤杂志.1995;11(3):189
188. Nakane A, Yoshida T, Nakata K, et al. Effects of lipopolysaccharides on human dental pulp cells. J Endod. 1995 Mar;21(3):128
189. Ruch JV, Lesot H, Begue – Kim C. Odontoblast differentiation. Int J Dev Biol. 1995 Feb;39(1):51
190. Dimitrios Jziafas: Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. Int J Dev Biol. 1995;39:281
191. Young WG. Growth hormone and insulinelike growth factor – 1 in odontogenesis. Int J Dev Biol. 1995;39: 203
192. Rach JV, Lesot H, Begne – kirn C. Odontoblast differentiation. Int J De v Biol. 1995;39:51
193. Kawase T, Orikasa M, Ogata S, et al. Protein tyrosine phosphorylation induced by epidermal growth factor and insulin – like growth factor – I in a rat clonal dental pulp – cell line. Arch Oral Biol. 1995;40(10):921
194. Bongenhielm U, Haegerstrand A, Theodorsson E, Fried K. Effects of neuropeptides on growth of cultivated rat molar pulp fibroblasts. Regul Pept. 1995 14;60(2 – 3):91
195. Nobuyuki Tani – Ishii, Kazuhiyo kuchiba, Tamotsu osada et al. Effect of T – cell deficiency of the formation of periapical lesions in mine histological comparison between periapical lesions – formation in BALB/C and BALB/c nu/nu mine. J Endod. 1995;21(4):195
196. Matsuo T, Nakanishi T, Ebisn S. Immunoglobulins in periapical exudat es of infected canals. Correlations with the clinical findings of the involved teeth. En dod Dent Traumatol. 1995;11:95
197. Takafumi Hamachi, Hisashi Anan. Akifumi Akamina, et al. Detection of IL – β mRNA in rat periapical lesions. J Endod. 1995;21:118
198. Matsuo T, Nakanishi T, Ebisu S. Immunolgobulins in periopical exudat es of infected root canals: correla-

tions with the clinical findings of the involved teeth. Endod Dent Traumator. 1995;11:95

199. Izumi T, Kobayashi I, Okamura K, et al. Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non - carious and carious teeth. Arch Oral Biol. 1995;40(7):609

200. 侯本祥. 内毒素脂多糖在牙髓炎症中致病机制的实验研究. 西安: 第四军医大学博士学位论文. 1996

201. Yoshiba K, Yoshiba N, Nakamura H, et al. Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in human teeth after pulp capping with calcium hydroxide. J Dent Res. 1996;75(8):1590

202. 侯本祥. 内毒素脂多糖在牙髓炎症中致病机制的实验研究. 西安: 第四军医大学博士学位论文. 1996

203. 陈强. 血小反衍化生长因子对牙髓和牙周组织细胞生物学作用的基础研究. 西安:第四军医大学博士学位论文. 1996

204. 王忠东、文玲英综述. 牙髓自身修复潜能研究进展. 国外医学 口腔医学分册. 1996;23(2):65

205. Nagaoka S, Tokuda M, Sakuta T, et al. Interleukin - 8 gene expression by human dental pulp fibroblast in cultures stimulated with Prevotella intermedia lipopolysaccharide. J Endod. 1996;22(1):9

206. Joseph BK, Savage NW, Daley TJ, et al. In situ hybridization evidence for a paracrine/autocrine role for insulin - like growth factor - I in tooth development. Growth Factors. 1996;13(1 - 2):11

207. 赵守亮综述. 破骨细胞形成和骨吸收机制. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1996;6(1):53

208. Kawashima N, Okiji T, Kosaka T, et al. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. J Endod. 1996;22(6):311

209. 郝建军. 激素和生长因子与牙乳头细胞、牙髓细胞、牙胚分化和矿化的关系. 第四军医大学博士学位论文. 1997

210. 文玲英、吴兴裕、朱明光. 内毒素血症致牙髓组织病理学改变的实验研究. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1997;7(4):224

211. Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: association with pulpal pain. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001;91(5):587

212. Kaneko T, Okiji T, Kan L, et al. An immunoelectron - microscopic study of class II major histocompatibility complex molecule - expressing macrophages and dendritic cells in experimental rat periapical lesions. Arch Oral Biol. 2001;46(8):713

213. Melin M, Joffre - Romeas A, Farges JC, et al. Effects of TGFbeta1 on dental pulp cells in cultured human tooth slices. J Dent Res. 2000 Sep;79(9):1689

214. Palosaari H, Tasanen K, Risteli J, et al. Baseline expression and effect of TGF - beta 1 on type I and III collagen mRNA and protein synthesis in human odontoblasts and pulp cells in vitro. Calcif Tissue Int. 2001;68(2):122

215. Tokuda M, Sakuta T, Fushuku A, et al. Regulation of interleukin - 6 expression in human dental pulp cell cultures stimulated with Prevotella intermedia lipopolysaccharide. J Endod 2001;27(4):273

216. Huang GT, Do M, Wingard M, et al. Effect of interleukin - 6 deficiency on the formation of periapical lesions after pulp exposure in mice. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral. 2001;92(1):83

217. Goldberg M, Six N, Decup F, et al. Application of bioactive molecules in pulp - capping situations. Adv Dent Res. 2001 ;15:91

218. Shimauchi H, Takayama S, Narikawa - Kiji M, et al. Production of interleukin - 8 and nitric oxide in human periapical lesions. J Endod. 2001;27(12):749

219. Palosaari H, Tasanen K, Risteli J, et al. Baseline expression and effect of TGF - beta 1 on type I and III

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

collagen mRNA and protein synthesis in human odontoblasts and pulp cells in vitro. Calcif Tissue Int. 2001; 68(2):122

220. Hosoya S, Matsushima K. Stimulation of interleukin - 1 beta production of human dental pulp cells by Porphyromonas endodontalis lipopolysaccharide. J Endod. 1997;23(1):39

221. Jepsen S, Albers HK, Fleiner B, et al. Recombinant human osteogenic protein - 1 induces dentin formation: an experimental study in miniature swine. J Endod. 1997;23(6):378

222. Fouad AF. IL - 1 alpha and TNF - alpha expression in early periapical lesions of normal and immunodeficient mice. J Dent Res. 1997;76(9):1548

223. Segura JJ, Jimenez - Rubio A, Calvo JR. Effects of formocresol alone vs. formocresol with eugenol on macrophage adhesion to plastic surfaces. Pediatr Dent. 1998;20(3):177

224. Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, et al. Immune defense mechanisms of the dental pulp. Crit Rev Oral Biol Med. 1998;9(2):179

225. Zhu Q, Safavi KE, Spangberg LS. The role of integrin beta 1 in human dental pulp cell adhesion on laminin and fibronectin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998;85(3):314

226. Webb PP, Moxham BJ, Ralphs JR, et al.. Immunolocalisation of collagens in the developing rat molar tooth. Eur J Oral Sci 1998 Jan;106 Suppl 1:147

227. Lertchirakarn V, Birner R, Messer HH. Effects of interleukin - 1 beta on human pulpal fibroblast proliferation and collagen synthesis. J Endod. 1998;24(6):409

228. Matsushima K, Ohbayashi E, Takeuchi H, et al. Stimulation of interleukin - 6 production in human dental pulp cells by peptidoglycans from Lactobacillus casei. J Endod. 1998;24(4):252

229. Hosoya S, Ohbayashi E, Matsushima K, et al. Stimulatory effect of interleukin - 6 on plasminogen activator activity from human dental pulp cells. J Endod. 1998;24(5):331

230. Shiba H, Fujita T, Doi N, et al. Differential effects of various growth factors and cytokines on the synthesis of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. J Cell Physiol. 1998;174(2):194

231. Tziafas D, Alvanou A, Papadimitriou S, et al. Effects of recombinant basic fibroblast growth factor, insulin - like growth factor - II and transforming growth factor - beta 1 on dog dental pulp cells in vivo. Arch Oral Biol. 1998 ;43(6):431

232. Nakashima M, Toyono T, Murakami T, et al. Transforming growth factor - beta superfamily members expressed in rat incisor pulp. Arch Oral Biol. 1998;43(9):745

233. Shiba H, Fujita T, Doi N, et al. Differential effects of various growth factors and cytokines on the synthesis of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. J Cell Physiol. 1998 ;174(2):1945

234. Tziafas D, Alvanou A, Papadimitriou S, et al. Effects of recombinant basic fibroblast growth factor, insulin - like growth factor - II and transforming growth factor - beta 1 on dog dental pulp cells in vivo. Arch Oral Biol. 1998;43(6):431

235. Denholm IA, Moule AJ, Bartold PM. The behaviour and proliferation of human dental pulp cell strains in vitro, and their response to the application of platelet - derived growth factor - BB and insulin - like growth factor - 1. Int Endod J. 1998;31(4):251

236. Jacobsen EB, Fristad I, Heyeraas KJ. Nerve fibers immunoreactive to calcitonin gene - related peptide, substance P, neuropeptide Y, and dopamine beta - hydroxylase in innervated and denervated oral tissues in ferrets. Acta Odontol Scand. 1998;56(4):220

237. Olgart L. The role of sensory nerves in the development of inflammation of oral tissues. Fogorv Sz. 1998;91(8

-9):247

238. Tziafas D, Papadimitriou S. Role of exogenous TGF - beta in induction of reparative dentinogenesis in vivo. Eur J Oral Sci. 1998 Jan;106 Suppl 1:192

239. Matsushita K, Motani R, Sakuta T, et al. Lipopolysaccharide enhances the production of vascular endothelial growth factor by human pulp cells in culture. Infect Immun. 1999;67(4):1633

240. Matsushita K, Motani R, Sakuta T, et. al. Lipopolysaccharide enhances the production of vascular endothelial growth factor by human pulp cells in culture. Infect Immun. 1999;67(4):1633

241. Huang GT, Potente AP, Kim JW, et al. Increased interleukin - 8 expression in inflamed human dental pulps. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1999 ;88(2):214

242. Levin LG, Rudd A, Bletsa A, et al. Expression of IL - 8 by cells of the odontoblast layer in vitro. Eur J Oral Sci. 1999;107(2):131

243. Sloan AJ, Smith AJ. Stimulation of the dentine - pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor - beta isoforms 1 - 3 in vitro. Arch Oral Biol. 1999;44(2):149

244. Sloan AJ, Matthews JB, Smith AJ. TGF - beta receptor expression in human odontoblasts and pulpal cells. Histochem J. 1999;31(8):565

245. Hao J, Wang P, Shi J. The effects of basic fibroblast growth factor on proliferation and differentiation of human dental pulp cells in vitro Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 1999;34(4):239

246. Onishi T, Kinoshita S, Shintani S, et al. Stimulation of proliferation and differentiation of dog dental pulp cells in serum - free culture medium by insulin - like growth factor. Arch Oral Biol. 1999 ;44(4):361

247. Sloan AJ, Smith AJ. Stimulation of the dentine - pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor - beta isoforms 1 - 3 in vitro. Arch Oral Biol. 1999 Feb;44(2):149

248. Walker KF, Lappin DF, Takahashi K et al. Cytokine expression in periapical granulation tissue as assessed by immunohistochemistry. Eur J Oral Sci. 2000;108(3):195

249. Berggreen E, Heyeraas KJ. Effect of the sensory neuropeptide antagonists h - CGRP((8 - 37)) and SR 140.33 on pulpal and gingival blood flow in ferrets. Arch Oral Biol. 2000;45(7):537

250. Lin SK, Hong CY, Chang HH, et al. Immunolocalization of macrophages and transforming growth factor - beta 1 in induced rat periapical lesions. J Endod. 2000 ;26(6):335

251. Roberts - Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. Arch Oral Biol. 2000;45(11):1013

252. Guo X, Niu Z, Xiao M, et al. Detection of interleukin - 8 in exudates from normal and inflamed human dental pulp tissues. Chin J Dent Res. 2000;3(1):63

253. Melin M, Joffre - Romeas A, Farges JC, et al. Effects of TGFbeta1 on dental pulp cells in cultured human tooth slices. J Dent Res. 2000;79(9):1689

254. Martinez EF, Machado de Souza SO, et al. Immunohistochemical localization of tenascin, fibronectin, and type III collagen in human dental pulp. J Endod. 2000;26(12):708

255. Wang P, Hao J, Shi J. Actions of bovine plasma fibronectin on cultured human dental pulp cells. Chin J Dent Res 2000;3(1):55

256. Felszeghy S, Hollo K, Modis L, et al. Type X collagen in human enamel development: a possible role in mineralization. Acta Odontol Scand. 2000;58(4):171

257. Tokuda M, Sakuta T, Fushuku A, et al. Regulation of interleukin - 6 expression in human dental pulp cell cultures stimulated with Prevotella intermedia lipopolysaccharide. J Endod. 2001;27(4):273

258. Nelson - Filho P, Leonardo MR, Silva LA et. al Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. J Endod. 2002;28(10):694.

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

259. Ko HJ, Lim SS. Production of macrophage inflammatory protein (MIP) – 1alpha and MIP – 1beta by human polymorphonuclear neutrophils stimulated with Porphyromonas endodontalis lipopolysaccharide. J Endod. 2002;28(11):754

260. Lu HX, Xiao MZ, Niu ZY, et al. Effect of IL – 1 on human dental pulp cells and pulpal inflammation. Int Endod J. 2002;35(10):807

261. Barkhordar RA, Ghani QP, Russell TR, et al. Interleukin – 1beta activity and collagen synthesis in human dental pulp fibroblasts. J Endod. 2002;28(3):157

262. Lin SK, Kuo MY, Wang JS, et al. Differential regulation of interleukin – 6 and inducible cyclooxygenase gene expression by cytokines through prostaglandin – dependent and – independent mechanisms in human dental pulp fibroblasts. J Endod. 2002;28(3):197

263. Pezelj – Ribaric S, Anic I, Brekalo I, et al. Detection of tumor necrosis factor alpha in normal and inflamed human dental pulps. Arch Med Res. 2002;33(5):482

264. Sloan AJ, Couble ML, Bleicher F, et al. Expression of TGF – beta receptors I and II in the human dental pulp by in situ hybridization. Adv Dent Res. 2001;15:63

265. Yang LC, Tsai CH, Huang FM, Induction of interleukin – 6 gene expression by pro – inflammatory cytokines and black – pigmented Bacteroides in human pulp cell cultures. Int Endod J 2003;36(5):352

266. Dobie K, Smith G, Sloan AJ, et al. Effects of alginate hydrogels and TGF – beta 1 on human dental pulp repair in vitro. Connect Tissue Res. 2002;43(2 – 3):387

267. Awawdeh LA, Lundy FT, Linden GJ, et al. Quantitative analysis of substance P, neurokinin A and calcitonin gene related peptide in gingival crevicular fluid associated with painful human teeth. Eur J Oral Sci. 2002;110(3):185

268. Rodd HD, Boissonade FM. Comparative immunohistochemical analysis of the peptidergic innervation of human primary and permanent tooth pulp. Arch Oral Biol. 2002;47(5):375

269. Awawdeh L, Lundy FT, Shaw C, et al. Quantitative analysis of substance P, neurokinin A and calcitonin gene – related peptide in pulp tissue from painful and healthy human teeth. Int Endod J. 2002;35(1):30

270. Kim SA, Lim SS. T lymphocyte subpopulations and interleukin – 2, interferon – gamma, and interleukin – 4 in rat pulpitis experimentally induced by specific bacteria. J Endod. 2002;28(3):202

271. Ribeiro Sobrinho AP, de Melo Maltos SM, Farias LM, et al. Cytokine production in response to endodontic infection in germ – free mice. Oral Microbiol Immunol. 2002;17(6):344

272. Rodd HD, Boissonade FM. Immunocytochemical investigation of neurovascular relationships in human tooth pulp. J Anat 2003;202(2):195

第十章 牙髓病理学

第一节 牙髓组织病理学的研究方法

组织病理学技术是研究和观察牙髓组织的发育、生长及疾病变化的重要手段，无论是在其诊断，还是在教学或科学研究工作中，凡是对牙髓组织进行微细结构的观察，大多要依靠组织学技术来完成。近十年来，随着科学技术的不断进步，以及各学科的相互渗透，组织病理学技术的发展也是日新月异，即使如此，新的技术方法仍然不能取代传统的一些组织病理技术。因此，根据所观察的对象不同，目的不同，侧重点不同，各种不同的组织病理学技术相互补充，可以更为详尽地观察和分析牙髓的组织病理学变化，并获得更多的信息。下面简述一些现今常用的组织病理学技术。

一、普通组织学技术(牙齿脱矿切片技术)

组织细胞的形态学指标是一种客观和科学的指标，因为普通组织学技术方法相对比较简单、重复性好，因而是目前采用最多的技术方法。

用普通的组织病理学方法可以获得对牙髓组织病理学改变的基本认识，可以进行牙髓各种疾病的基本诊断。

对于用去髓术(或称拔髓术)获得的牙髓进行一般的组织病理学观察，采用最常见的组织标本制作法。抽出的牙髓立即用10%的中性福尔马林液或10%缓冲福尔马林液(pH7.4～7.6)固定2～4 h，然后进行常规组织处理，石蜡包埋，切片后用苏木精－伊红(HE)染色，封片后就可以进行观察。但在观察完整的牙齿中的牙髓时，由于牙齿是高度矿化的硬组织，特别是釉质为全身中最坚硬的组织，不脱去矿物质是无法完成标本切片任务的。因此，脱矿是完成切片，并获得高质量染色效果的重要环节。

由于牙齿只有根尖孔与外界交通，是不易渗透的，在进行动物实验时应尽可能地在取材前先进行内固定，即先经过动脉插管，经肝素生理盐水冲洗后进行特定固定液的灌注，可以保证牙髓组织的充分固定以保持原有的形态。此后的再固定与拔髓法获得的牙髓的固定法相同，此外还可以用Bouin固定液、苦味酸－硫酸固定液、Zenker固定液等多种固定液进行固定，这些固定液的配方及使用方法在一般的组织学技术书上都可以查阅到。

此后，可对牙齿进行脱矿处理。脱矿的目的主要是将组织中的矿物质除去，且不改变组织的基本结构，还使得组织变软以便较易切成薄片。脱矿的方法很多，归纳起来有：用一种或多种酸去除矿物质、借离子交换法使矿盐除去、用螯合剂使矿盐去除、用电解方法脱矿等。下面介绍一种固定兼脱矿液体的配方：

氯化钠	8.5g
蒸馏水	1000 mL
甲醛	100 mL

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

浓盐酸	70 mL
甲酸	80 mL
氯化铝	40 g
冰醋酸	25 mL

将以上各组分混合即成固定兼脱矿液。脱矿时间为 3 ~ 7 d。牙齿经脱矿后要用稀氨水浸泡 2 ~ 4 h 进行中和，然后用流水充分冲洗 24 h，此时可对牙齿进行分切、修整。随后进行常规的脱水、透明、浸蜡、包埋。如果希望缩短脱矿时间，也可以在脱矿前先用电动金钢砂外圆分切片将牙齿纵剖。

脱矿后的切片可进行多种染色以观察牙髓的不同组织成分，常规染色方法为 HE 染色方法。

二、特殊染色

在观察牙髓的病理学改变时，用普通的 HE 染色可解决大部分问题，但是要想显示其中的一些微细的变化或特殊物质的改变，如胶原纤维、弹力纤维、神经纤维、基质中的蛋白多糖等，需用一些特殊的染色方法来进行标记。特殊染色一般都是在牙齿已经固定、脱矿后的切片上进行，方法多种多样，如用硝酸银沉淀法（Lillie 法）、Van Gieson 染色法、Mallory 三色法等，这些方法都比较简单，可以参照一些组织技术方法的参考书上的方法和步骤完成。

三、组织化学（histochemistry）

应用组织技术研究牙髓中成纤维细胞以及成牙本质细胞中碱性磷酸酶的改变有很多报道，它主要是用来观察组织细胞中酶的活性，用以分析牙髓组织细胞的分化和牙髓组织修复牙本质的能力。这种方法不仅可以揭示普通形态学方法所不能观察到的组织、细胞的化学成分的变化，而且往往在尚未出现组织细胞形态结构改变之前就能查出其化学成分的变化。

对于碱性磷酸酶活性的组织化学检查法，可分为金属盐法（如 Gomort 氏改良钙 - 钴法）和偶氮耦联法（萘酚磷酸显示法）。金属盐法是利用金属离子择取酶水解底物后，生成游离磷酸离子，使其沉淀的方法。偶氮法是把 β - 磷酸萘酯钙水解，生成 β - 萘酚，用重氮盐捕捉，生成红色的重氮色素沉淀。

使用这种方法时，采用新鲜标本的冰冻切片进行染色，观察效果较好。

四、电子显微镜技术（electron microscope）

用光学显微镜可以观察到牙髓一般的组织学结构和变化，但如果想观察更细微的结构，如在病理改变中牙髓小血管内皮细胞和神经纤维的变化、成牙本质细胞和牙髓细胞胞浆中细胞器（如线粒体、核糖体、内质网等）、凋亡小体以及其他一些大分子物质时，必须用电子显微镜来观察。电子显微镜技术分为透射电子显微镜（transmission electron microscope，TEM）和扫描电子显微镜（scanning electron microscope，SEM），观察牙髓的病理变化较多采用透射电镜（TEM）技术。

TEM 标本制作也是经过固定、包埋、切片、染色等程序，但 TEM 是以电子束为光源，穿

透力低，而放大倍数和分辨率比光镜大得多，故标本制作的要求更为严格。无论是抽出的牙髓，还是整体牙的牙髓，取材时要尽可能地缩短取材时间。如实验对象是动物牙齿，应尽可能地行血管灌注内固定，以达到快速及时地在原位固定组织细胞结构，减少组织的自溶现象，较好地保存组织的细微结构。常用的固定剂有戊二醛、多聚甲醛或锇酸。此外，取材组织块要小（$1mm^3$），可以使组织得到充分的固定。如观察的标本为牙本质－牙髓复合体，在固定之后还需进行脱矿。一般认为 10% EDTA（乙胺四乙酸）作为脱矿液时，组织的细微结构、酶和抗原的活性保存较好，脱矿时间取决于组织块大小，一般两周左右即可。标本进一步经过脱水、浸透和包埋后，用超薄切片机切成厚 50～80 nm 的超薄切片，醋酸铀和柠檬酸铅等重金属电子染色后，形成黑白反差，电镜荧光屏显影观察和摄像。

SEM 用来观察细胞和组织的表面结构，样品制备方法较简单。组织固定后无需包埋、切片，在真空镀膜仪内干燥后，于组织块表面随后喷镀一层碳膜和合金膜，即可置 SEM 下，荧光屏上电子扫描显影摄像。

五、免疫细胞化学(immunocytochemistry)和免疫荧光术(immunofluorenscence)

免疫细胞化学和免疫荧光是应用特异性抗原抗体结合原理，检测细胞内多肽、蛋白质等大分子物质的分布。这种方法的特异性强，敏感度高，已成为研究牙髓组织细胞和基质中特殊成分的一种主要方法。尤其是单克隆抗体技术的应用，以及标记技术的不断改进、敏感度的提高，更加速了这种技术的广泛应用。如对牙髓病理改变时 IL－1、IL－2、IL－6、IL－8、肿瘤坏死因子(TNF)、转化生长因子(TGF) 的观察，对于牙髓成牙本质细胞中的牙本质磷蛋白(DPP)、骨形成蛋白(BMP)的观察，对于多种类型胶原、Fn 的观察等等。

免疫细胞化学方法与免疫荧光技术相比较，具有敏感度高、特异性强、标记方法多、定位准确、易于保存和应用广泛等优点。免疫细胞化学的关键在于获得高质量、高效价的标记免疫血清，制备可以充分暴露抗原的标本，根据不同的组织标本要选择合适的抗体浓度，根据不同的抗体要对组织标本进行特定的处理。免疫细胞化学常用的方法包括可溶性酶－抗酶复合物法(PAP 法)、亲和细胞化学法(如卵蛋白－生物素复合物法－ABC 法)以及国际上一些商业公司发展起来的其他一些方法。目前这些方法的主要试剂都已试剂盒化，应用起来比较简单、省事，研究者可以根据自己的兴趣进行选择。

六、原位分子杂交技术(in situ hybridization)

用免疫细胞化学可以检测到牙髓组织细胞中的多肽、蛋白质等大分子物质的分布，如果希望了解和认识产生这些多肽和蛋白质的基因水平的变化，则需用核酸分子杂交的方法。核酸分子杂交的基础是核酸分子单链之间有互补的碱基顺序，通过碱基对之间非共价键的形成而出现稳定的双键区。分子杂交可在 DNA 与 DNA、RNA 与 RNA 或 RNA 与 DNA 的两条单链之间进行。

原位杂交组织化学(in situ hybridization histochemistry)简称原位杂交(in situ hybridization)，是应用已知碱基顺序并带有标记物(如地高辛、生物素、放射性元素等)的核酸探针、组织细胞中待测的核酸按碱基配对原则进行特异性结合，形成杂交体，然后再应用与标记物相应的检测系统，通过组织化学或免疫细胞化学方法在核酸原有的位置进行细胞内定位。这一技术为研究单一细胞中编码各种蛋白质、多肽的相应的 RNA 的定位提供了手段。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
更多电子书，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注领取

原位杂交技术应用时为达到最佳的检测效果，在处理组织标本时应注意保持细胞结构，保持细胞内 DNA 或 mRNA 的水平，防止外来的无关的 DNA 或 mRNA 的污染，以及使探针易于穿透组织和细胞。杂交的步骤基本为：

1. 杂交前准备，包括固定、取材、玻片和组织的处理。
2. 杂交。
3. 杂交后处理。
4. 放射自显影或非放射性标记的显色。

目前市场上已有配套的原位杂交标记试剂盒和检测盒，为研究者提供了便利。

七、组织培养技术

前述的几种方法都是取人或动物的牙齿或牙髓组织固定处理后进行组织学观察。组织培养(tissue culture)或称体外实验(in vitro)则是取牙髓活组织或活细胞在体外适宜的环境中培养，尔后进行相应的实验研究。尽管体外实验不能完全地模拟机体的环境和缺乏全身因素的影响，但在体外实验研究中仍比活体实验(in vivo)易于控制影响因素和实验条件，达到模拟局部组织环境的目的。体外实验可以观测一种或几种因素(或因子)对于牙髓组织细胞的影响，可以观察到成活的牙髓组织细胞的变化，更易进行牙髓组织细胞增殖、分化、移行等动态的观察。

八、形态计量学方法(morphometry)

形态计量学是数学方法与组织形态学结构相结合而产生的一种组织病理学研究方法。由于这种方法更主要的是基于客观的指标和参数，可以用几种方法测量已知物体的体积、表面积、长度、直径、数量等指标，将这些通过测量所获得的原始数据用形态计量学方法中的一些公式，通过计算转变为一些有实际意义的参数。这种方法可以减少那些由于主观原因而导致的失误，并且可以发现那些用常规方法无法发现的现象，因而目前形态计量学方法被用于病理诊断、组织学、细胞生物学的研究。

最为常用的形态计量学方法是数点法(point counting)，因这种方法是一种以手工测量为主的方法，不需要复杂的技术和仪器设备，应用较为广泛，更多地用于组织和细胞超微结构的分析。

在以往的研究中，一般先将组织图像(光镜或电镜)转换成一定倍数的照片，或用投影仪将组织图像投射在平滑的墙壁上，然后进行测量。测量时可根据需要选用不同的测试网格(可自己用透明胶片制备)进行数点测量。虽然这种方法费时，但对于一些超微结构(如各种细胞小器、桥粒等)的定量观察是行之有效的。以后，也有人用显微镜目镜中的测试网格对组织切片进行直接的测量，这种方法简便易行，比较容易推广，尤其适用于一些结构和外形清晰的定量(如新生牙本质桥长度和面积、胞核着色的定量等)。目前，随着计算机的普及和开发，将显微观察系统与计算机直接相联，也可以对组织切片进行直接的测量，同时，在一些软件系统的协助下，更省时省力，可以直接获得经过计算后的参数。这种方法可以使图像分析达到半自动化和自动化，要比早年的数点法测量速度快，精确度高，重复性好，并可以对组织切片进行直接的测量分析，尤其是可以对用免疫组化、原化杂交以及其他一些特殊染色的切片进行测量，因而目前已开始较多的被用于对组织细胞的形态计量学研

究。

总之，上述的各种形态计量学方法是在特定的时期发展起来的，有其特殊性，但是其基本原理都是相同的，而且相互间尚不能完全替代。总之，选用适当的形态计量学方法应用于研究观察中，可以对观察的对象同时获得质和量两方面的信息，改变以往的主观描述，使得结果更客观、更可信，重复性和可比性更强。

第二节 牙髓炎

牙髓是牙体组织中唯一的软组织，是一种有精细结构、疏松的结缔组织，包含有数量众多、管壁很薄的血管和只有痛觉感觉的神经。牙髓的四周被牙本质包围，仅靠狭窄的根尖孔与外界沟通。如同身体其他部位的结缔组织一样，牙髓对于外界各种不同的刺激和损伤也发生不同程度的反应，但由于牙髓本身的结构特点和所处的特殊环境，牙髓的这种反应也具有自身的特点。牙髓的反应常常表现为牙髓炎(pulpitis)，根据刺激和损伤的程度、牙髓本身活力，牙髓炎症反应的程度也有所不同。因此，受外界刺激后牙髓的变化可分为以下几种类型。

一、牙髓充血

牙髓炎症的早期往往表现为牙髓充血(pulp hyperemia)，主要是牙髓腔内的血管由于受到细菌毒素或其他理化因素刺激后所发生的扩张性充血。在牙髓充血与牙髓炎症之间往往很难划一明确界限。也有学者将牙髓充血称之为牙髓炎的过渡阶段，指症状轻微，能够恢复。牙髓充血主要还是由龋病引起的，又称局灶性可逆性牙髓炎。由龋损细菌产生的毒素和龋损组织的分解产物使牙髓受到低度、慢性刺激，牙髓充血的结局取决于这种刺激是否持续作用于牙髓。

除病理性牙髓充血外，牙髓还可发生生理性充血，主要发生于牙齿的发育，乳恒牙替换时的乳牙根吸收以及其他的一些全身性因素，如月经期、妊娠期、潜水或高空飞行等，这些因素都能引起暂时性的牙髓充血。

牙髓充血在显微镜下表现为牙髓中的血管扩张、充血，血管呈树枝状，扩张充血的血管常局限在受刺激相应的牙髓侧。此外，还可见组织水肿和血细胞由扩张血管渗出。如血肿进一步发展可导致血栓形成，并造成牙髓坏死。

二、急性、慢性牙髓炎

在牙髓的各种疾病中，牙髓炎最常见；在各类牙体疾病中，牙髓炎也是最常见的。

牙髓由于牙本质形成的髓腔大大局限了牙髓承受肿胀的能力。因此，由于炎症引起的渗出使牙髓压力增高，微循环的静脉回流进一步受阻。继而导致的局部组织缺血和缺氧，使局部牙髓组织坏死。坏死组织释放化学介质更加重了炎症和水肿，其结局可以导致全部牙髓的坏死。

龋病是对牙髓刺激的最常见因素，这种刺激早期表现为相应部位成牙本质细胞层下方少量淋巴细胞、浆细胞和吞噬细胞扩散浸润。在周边区域可见肉芽组织形成，一般在这个阶段没有明显的急性渗出性变化。而当龋损抵达牙髓时，相应区域牙髓的血管出现扩张、

充血和炎性水肿,局部微循环受阻并导致局部牙髓坏死,中性粒细胞从血管中移出后进入牙髓组织和邻近的牙本质小管。由于中性粒细胞逐渐聚集并在死亡前释放溶解酶,使得局部组织坏死并容易形成化脓。化脓可以是扩散的或局部的(即牙髓脓肿)。此外,炎症组织的免疫反应也可以促进组织的破坏。

由其他原因导致的牙髓炎的组织学表现与龋病引起的炎症基本相同,只是牙髓对这些刺激的反应可表现为急性渗出性炎症,如在制洞中的机械性刺激或一些充填材料的刺激,除引起急性渗出性炎症外,还可使成牙本质细胞移位、胞核进入牙本质小管以及成牙本质细胞数量减少。

由于牙髓炎的表现形式的不同,在临床和病理上经常将牙髓炎进行分类,如急性和慢性、浆液性和化脓性、局部性和全部性等等。但是,对多年的临床和病理对照观察后,发现各种牙髓炎的临床诊断与组织病理学诊断的符合率较低,为 22% ~ 68%。为此,史俊南(1985)根据长期观察研究,提出了新的分类和诊断标准,新的诊断和分类的可靠性在以后其他的报道中得到证实。目前普遍认为:对于牙髓炎没有必要进行过于细致的分类,临床上观察到的牙髓炎主要是慢性牙髓炎、慢性牙髓炎急性发作,单纯的急性牙髓炎还是比较少的。

(一)急性牙髓炎(acute pulpitis)

急性牙髓炎常由龋病、牙体手术或外伤所引起。龋病引起者往往是慢性牙髓炎的急性发作,在镜下常常见到急性炎症与慢性炎症的同时存在。早期以渗出为主,主要表现为牙髓中血管扩张、充血。由于牙髓血管壁较薄以及牙髓血管内皮细胞受损伤,使血管壁的通透性增加,出现炎性渗出,导致组织水肿,以中性粒细胞为主的多种炎细胞也由扩张的血管壁游出并聚积于炎症反应区。白细胞在吞噬细胞的同时也受各种损伤因子的作用而发生变性坏死,释放溶酶体酶,使自身和坏死组织溶解液化,并形成局限性脓肿。若此时得不到及时治疗,龋洞本身又无明显开放的露髓孔,牙髓局限性的炎症和脓肿可迅速扩展到全部牙髓,中性粒细胞充满整个牙髓腔,形成急性化脓性牙髓炎(acute suppurative pulpitis)。

(二)慢性牙髓炎(chronic pulpitis)

慢性牙髓炎大多由龋病引发,临床上常可发现患牙有明显的龋洞形成,但牙髓仍有活力。慢性牙髓炎除少部分由急性牙髓炎转变而来,大部分仍是初发即是慢性炎症。临床上根据患牙发病时间、各种症状表现的特征和检测的结果进行诊断,一般统称为慢性牙髓炎。在病理学上,由于可以观察到更为细致的组织学改变,根据龋洞的特点、牙髓组织学反应的程度等情况将慢性牙髓炎进一步分为以下两种情况。

1. 慢性闭锁性牙髓炎(chronic closed pulpitis):

在龋洞形成但尚未露髓的情况下表现为慢性闭锁性牙髓炎,与龋损相应的牙髓端在缓慢、低毒的作用下出现慢性炎症过程,主要表现为毛细血管扩张,在成牙本质细胞层的下方有淋巴细胞、巨噬细胞、浆细胞等慢性炎症细胞。成纤维细胞、胶原纤维和毛细血管增生,形成炎性肉芽组织。病变一般在冠髓较为明显,而根髓的炎症轻微。有时有成束的胶原纤维将炎症区与周围无明显炎症的牙髓分隔。在急性期形成的一些局限性脓肿周围已有纤维组织包绕,限制脓肿的进一步发展。

2. 慢性溃疡性牙髓炎(chronic ulcerative pulpitis):

病理学上对于龋病髓腔开放的慢性牙髓炎又将其称为溃疡性牙髓炎。镜下可见溃疡

表面有食物残屑、炎性渗出物、坏死组织覆盖，在暴露的牙髓表面有密集的炎症细胞，其下方为炎性肉芽组织和一些增生的纤维组织。有时在牙髓表面可见钙化物质沉积或部分牙本质桥形成。慢性牙髓炎的病变发展过程虽然缓慢，但持续发展可累及全部牙髓并导致牙髓死亡。长期处于慢性炎症的牙髓，其炎症产物可通过根尖孔进入根尖周组织，导致慢性尖周病变。

三、牙髓牙周联合病变

牙髓病和牙周病都是口腔常见的疾病，常常单独发生，但二者有时合并发生，形成牙髓牙周联合病变，有人称之为牙髓牙周综合征，或牙髓牙周合并征。

在相互关系上，有的是原发性牙髓病继发牙周感染，有的是原发性牙周炎继发牙髓感染，有些情况下两者同时合并发生。牙髓牙周联合病变的发病基础是由于牙髓组织和牙周组织在胚胎发育过程和正常的解剖生理方面有种种联系。由于牙髓、牙周组织血液循环的相互交通，以及根尖孔、侧支或副根管、暴露的牙本质小管、根面龋等等因素导致的牙髓组织与牙周组织之间的相互直接交通，这些都可以成为二者相互影响和传递炎症的渠道。原发性牙周炎继发牙髓炎者，牙髓大多仍有活性，伴有炎症状况，由于其感染途径与龋性牙髓炎恰恰相反，是经过根尖孔或侧支根管、副根管而感染牙髓的，所以又称作逆行性牙髓炎或上升性牙髓炎(ascending pulpitis)。在病理学上，牙周病变对牙髓的影响表现为炎症、钙化、充血、牙髓萎缩；牙髓病影响牙周组织的主要病理变化表现为牙周组织的炎症，如根分叉区或尖周区的肉芽肿、牙龈脓肿或牙周脓肿。

四、牙髓息肉(pulp polyp)

牙髓息肉又称慢性增生性牙髓炎(chronic hyperplastic pulpitis)，牙髓患慢性炎症时，如果牙露髓孔区宽大使牙髓广泛暴露，且牙齿的根尖孔较宽，牙髓的血液循环丰富，在这种情况下牙髓炎症以增生为主，形成炎症性肉芽组织。所以患者多为儿童或青少年，发生在有大的露髓孔的乳磨牙或第一恒磨牙。临床上可观察到牙髓增生的炎性肉芽组织向外突出，形成红色或粉红色息肉，充满整个龋洞。镜下为增生的结缔组织，含有丰富的毛细血管，并有浆细胞、淋巴细胞等慢性炎症细胞的浸润。息肉的表面有复层鳞状上皮覆盖。推测其上皮来源可能由口腔黏膜具有分裂增殖能力的脱落细胞移植而来，或由龋洞附近的牙龈上皮增殖而来。此外，牙髓息肉应与来自牙龈或牙周膜的息肉相区别，通过检查息肉的蒂可以找出息肉的起源。

五、牙髓炎与氧衍生自由基

自由基(free radical)是指具有不配对电子的分子、原子、离子或原子团，自由基种类繁多，在机体内氧衍生自由基具有特殊的意义。正常生理条件下，机体内可通过酶促反应和非酶促反应产生少量自由基，但这些自由基可迅速被体内的多种清除剂所清除，其中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)在机体内清除自由基的作用最受重视。自由基的产生和清除处于一种动态平衡状态，这一平衡一旦被破坏，机体内的组织细胞就有可能受到损伤。

(一)牙髓炎时 SOD 的变化

SOD 是一种含有铜、锌等金属辅基的酸性蛋白，主要分布于真核细胞浆，分子量约

32kDa，由两个大小相同的多肽亚基组成，每个肽链含有 150 多个氨基酸，与金属辅基呈共价键结合。分离提纯后的 Cu, Zn – SOD 呈浅蓝色结晶。SOD 的稳定性在去除金属辅基层后明显下降，此外，SOD 的热稳定性与所处环境的离子强度有关，其热稳定性与离子强度呈反比关系，即离子浓度低，则热稳定性高。在离子浓度相当低时，在温度为 75℃～95℃时仍可保持一定稳定性。SOD 的稳定性随着机体的衰老也有所下降。

SOD 是生物体内清除自由基的重要酶系之一，其主要的生理作用是清除机体内过量的超氧阴离子自由基 O_2^-。SOD 在抗炎、抗超氧化物和抗病毒方面发挥着重要的作用，尤其是在机体组织抵抗炎症中的作用更为引人注目。但是，SOD 抵抗炎症的能力是有限的。吴补领、史俊南、王多宁(1990)对牙髓炎中 SOD 的水平进行了观察，发现无论是慢性牙髓炎还是急性牙髓炎，SOD 的含量均明显低于正常牙髓，这可能是由于牙髓炎症发生过程中 SOD 因其清除 O_2^- 过程中发生消耗，含量下降。此外，炎症导致牙髓缺血、缺氧也可使 SOD 的合成发生障碍，使其含量下降。由于 O_2^- 及其派生的活性氧与炎症有关，当炎症发生时，SOD 通过稳定细胞膜和溶酶体膜，防止在组织中形成过多的超氧化物，减少炎细胞的渗出和聚集，防止自由基的继发反应。

目前最新的研究显示：SOD 与牙髓细胞的增生有着密切的关系，且可促进牙髓组织的修复再生。张亚庆、肖明振、杨永进(1995)将 SOD 复合氢氧化钙用做猴磨牙切髓术的盖髓剂，结果显示：SOD 与氢氧化钙复合诱导牙本质桥形成的效果，优于单纯使用氢氧化钙。

(二)牙髓炎与氧衍生自由基

自由基最基本的特征是具有未配对电子，故具有未配对电子的原子、原子团、离子以及分子都是自由基。自由基的种类繁多，在机体内氧衍生自由基具有特殊的意义。在生物体内许多化学反应都与氧有关，氧是生物体内最重要的电子受体。氧在还原时由于获得电子个数不同，可以形成多种不同的产物如氧自由基(O_2^-)、羟自由基(OH^-)。在正常生理条件下，机体内可通过酶促反应和非酶促反应产生少量氧自由基，但很快即被 SOD 等体内清除剂清除。在机体正常代谢下，细胞产生的氧自由基和细胞本身对该类自由基的清除处于平衡状态，这种平衡一旦失调就有可能导致炎症等许多疾病的发生。

研究发现：当中性粒细胞受到致炎因子的激活而产生的氧衍生自由基，除了破坏细胞本身外，还可释放到细胞外，使细胞间质透明质酸降解，同时还可损伤邻近的细胞，并促使组织细胞代谢产生化学趋化物和炎症介质。

国内吴补领、史俊南、王多宁(1990,1991)对牙髓炎组织中氧衍生自由基进行了较多的观察研究，分别采用液氮低温冷冻电子共振(ESR)技术和放免分析法(RIA)等方法，发现在各种类型牙髓炎病变组织中的自由基高于正常牙髓组织，其中自由基的类型以超氧自由基为主。由于自由基可直接参与炎症反应，促使炎症介质增多，并使血管通透性增加；与此同时 SOD 的损耗增加，合成下降，使得超氧自由基的含量进一步升高，进一步促进牙髓炎的发展和加重。因此，在研究牙髓炎症的发生、发展的病理生理机制方面，氧自由基是一个不能忽视的问题，此外，在治疗牙髓炎时也是一个应该考虑的方面。

第三节 牙髓变性

牙髓变性(degeneration of pulp)是指牙髓组织由于各种原因导致的代谢发生障碍，形成

各种变性或退行性变的形态改变。牙髓变性的起因比较复杂，有增龄性变性，龋病、牙周病、创伤、牙体手术引起的变性，全身因素也可引起变性。牙髓组织的代谢障碍是由于牙髓血液循环较差，再加上增龄变化或其他长期较缓和的刺激所引起的。由于牙髓变性发展过程缓慢，临床上不出现明显症状。常见的牙髓变性有以下几种：

一、退变(retrogressive changes of pulp)

牙髓组织的退变在组织学上主要表现为以下几种形式：

(一)脂肪性变(fatty degeneration of pulp)：这种变性往往是其他变性的早期变化，在组织学上表现为在牙髓细胞、成牙本质细胞以及血管壁上出现大小不一的脂滴或脂肪颗粒。可由微生物产生的毒素、化学物质、牙髓血液循环障碍或缺氧而引起。

(二)成牙本质细胞层空泡性变(vacuolar degeneration of odontoblastic layer)：是牙髓对炎症、制洞、有刺激性充填物等刺激所产生的反应。这种变性主要发生在成牙本质细胞层中，组织学上表现为成牙本质细胞内和细胞间有液体积聚，形成水泡并挤压邻近成牙本质细胞，使得成牙本质细胞的结构破坏，严重时细胞消失，仅留下一些泡样结构。

(三)牙髓网状萎缩(reticular atrophy of pulp)：这种变化常见于根尖孔已完成的牙齿中，随年龄增加而增加，组织学上表现为在牙髓组织中出现一些大小不等分散的泡状间隙，充满组织液，牙髓细胞体积变小、数量减少，细胞间隙增大，整个牙髓呈网状结构，网孔内充满液体。此外，血管和神经也大多消失。由于网状萎缩也可出现在固定不好的标本中，因而，判别这种组织学变化是否是病理现象时应慎重。

(四)纤维性变(fibrous degeneration of pulp)：是牙髓对龋病、创伤、牙周病、牙体手术以及增龄的反应。组织学上表现为牙髓内细胞成分减少，纤维组织增多，在严重情况下，细胞成分完全消失，仅留一些粗大的纤维聚集形成均质性的玻璃变性。

二、钙变(pulp calcifications)

牙髓钙变有两种形式：一种是弥散性钙化(diffuse calcification)，另一种是髓石(pulp stones)形成。牙髓钙变的形成是由于增龄的原因，或者是牙髓对外伤、龋病或牙周疾病的反应。目前认为：牙髓钙变是在牙髓坏死细胞、围绕在血管周围的胶原纤维、血管中的小血栓的基础上形成的。牙髓钙变的出现频率较高，据 Arys A，Philippart C，Doarov N(1993)对未经脱钙处理的牙髓的观察，发现有 95%的牙髓中有不同程度的钙变，他还发现龋病是引起牙髓钙变的重要原因，经过龋病治疗后的牙髓钙变率有所下降。

弥散性钙化发于根髓内，表现为在牙髓内沉积无数大小不等的钙盐颗粒或钙化块，形状不规则，有的呈圆形或条索状，条索状走行方向与根管一致。髓石的形成多见于髓室，表现为一些大小不等圆形、卵圆形或不规则圆形的钙化团块，常围绕一核心成层状。极少的髓石内含有不规则的牙本质小管，也有人将这种髓石称为牙本质小体(free denticle)。髓石可游离于髓室内，或附着甚至包埋于髓室壁，有时充满髓室使根管不通，并可妨碍牙髓和根管的治疗。髓石出现频率虽高，但一般没有病理意义，临床上一般不表现出明显的症状。只有为数不多的髓石会引起强烈的疼痛，认为是压迫牙髓神经所致。

此外，在一些发育异常的牙体组织中也可见到一些类似牙髓钙变的情况，如牙髓发育异常症、牙本质发育异常以及遗传性乳光牙本质等的髓腔内可见到髓石、牙本质样颗粒或

钙化物沉积。

三、化生(metaplasia of pulp)

化生是指一种组织受到刺激、损伤或其他局部或全身因素的影响下转变为另一种组织。牙髓化生是指牙髓的纤维性结缔组织转变为骨组织或牙骨质。真正的牙髓化生在人类中并不多见,而常见的组织学现象是根管的近根尖处有牙周膜长入形成牙骨质。

第四节 牙髓坏死

牙髓坏死(pulp necrosis)是指牙髓组织的死亡。由于牙髓处于髓腔这种相对封闭的环境中,其血管壁薄易渗透,在炎症状况下由于扩张的血管通透性增加,使组织中液体增多,增大了髓腔内组织压力。如果这种症状得不到缓解的话,进一步形成血液循环的障碍,最终导致牙髓坏死。因而,牙髓坏死多是未经治疗的急性或慢性牙髓炎的自然结局,一般都伴有细菌感染。除此之外,牙齿受创伤使得根尖血管断裂、阻塞,或牙髓受化学药物的刺激,如亚砷酸、多聚甲醛,或涂于深洞的某些腐蚀性药物等,都能引起牙髓急剧坏死。此外,增龄或严重进行性变性也可引起牙髓的渐进性坏死。后两种牙髓坏死(渐进和急剧性)都属于无菌坏死。

牙髓坏死若伴发腐败菌的感染,又称牙髓坏疽(gangrene of pulp)。这种类型的牙髓坏死由于坏死组织被腐败菌分解产生吲哚、尸胺、硫化氢等,常有强烈的臭气。

牙髓坏死在显微镜下表现出典型的组织细胞坏死的病理变化,可出现细胞的核固缩、核碎裂和核溶解,与此同时胞浆也逐渐崩解,细胞轮廓消失,组织完全破坏呈现弥漫的固形质状。此外,牙髓坏死后由于其中血红蛋白的分解,其产物可成为牙齿变色的原因。

第五节 内吸收

内吸收(internal resorption)是指牙髓组织对构成髓腔的牙本质进行吸收,导致髓腔增大。其原因不清,可能与创伤、炎症或切髓术有关,表现为牙髓组织转变为高度血管化的肉芽组织,并具破牙本质细胞的活性,首先破坏成牙本质细胞层和前期牙本质,此时出现较多的破骨细胞样的破牙本质细胞(dentinoclasts),并进一步破坏牙本质,引起髓室壁由内向外的吸收过程。内吸收较少见,多数发生在单个牙,在髓腔的各个部位都可发生,但以根中部为起点向周围扩展多见。若吸收发生在冠部,当吸收达到牙表面时肉芽组织及外渗红细胞的颜色可透过薄层釉质,使牙冠显示出粉红点。除此之外,内吸收一般无自觉症状。

显微镜下观察可见牙髓为充血的肉芽组织,在被吸收的牙本质表面可见有不规则的凹陷,有时在凹陷内可见有多核的破骨细胞样破牙本质细胞。有时可见吸收和修复两种过程同时出现。在吸收凹陷内,部分地被修复性牙本质或骨样牙本质所填补,但新形成的修复组织又可被再吸收。

如不经过治疗,则内吸收可在局部完全穿透牙本质和釉质或牙本质和牙骨质,此时常需拔除患牙。未穿透的内吸收必须进行去髓术才能使吸收停止。

第六节 尖周病

牙髓病无论是变性还是炎症，如果未经及时治疗，都可以产生尖周组织或周围颌骨的疾病。由于牙髓炎在牙髓病中占据的比例较高，因此，尖周病(periapical diseases)大多是牙髓炎的继发症。与牙髓病不同的是：由于尖周组织的血液循环畅通，不易受阻(有丰富的血管网和侧支循环)，尖周组织中有丰富的细胞成分，抵抗疾病的能力要强于牙髓组织，这使得尖周病表现为多种形式，以慢性局限性病变为主。

一、急性尖周炎(acute periapical inflammation)

急性尖周炎是指发生在根尖孔周围组织的急性炎症，大多是龋病、牙髓炎、牙髓坏死的继发病，此外，牙齿外伤、根管治疗术时药物渗透以及器械损伤尖周组织等原因也可引起尖周急性炎症。急性尖周炎可由急性牙髓炎直接转变而来，但更常见的是慢性炎症的急性发作。

急性尖周炎的早期以浆液性渗出为主，有人将之称为急性浆液性尖周炎。组织学上可见尖部牙周膜充血，浆液性渗出，组织水肿，中性粒细胞浸润。但是，这种状态维持时间很短，很快发展为尖周急性化脓性炎症，将其称为急性尖周脓肿(actute periapical abscess)。由于临床上大多数急性尖周炎都处于尖周脓肿的状态，因而有人将急性尖周炎又称为急性尖周脓肿。

病理学上表现为尖周区大量中性粒细胞渗出、聚集，局部组织坏死液化，脓肿形成，并向邻近骨髓腔扩展。在镜下可见到脓肿中心为崩解坏死的液化组织和脓细胞，周围有中性粒细胞围绕，边缘区可见巨噬细胞，邻近的牙周膜和骨髓腔也可见到血管充血和炎细胞浸润。

尖周急性脓肿的形成使得患者感到持续性疼痛，此时若开放根管使脓液引流，则症状可以迅速缓解。若脓肿得不到及时引流，则在局部压力作用下最常见的自然排脓途径是通过尖周区松质骨到达牙槽骨的骨外板，并进一步穿透口腔黏膜而形成尖周脓肿、牙槽骨骨膜下脓肿和黏膜下脓肿3个阶段，即临床上所称的急性牙槽脓肿(acute alceolar abscess)。如果脓液在面部肌肉间隙和颌骨内扩散又可发展为面颌蜂窝织炎和颌骨骨髓炎，但临床上不是很多见。急性尖周脓肿除通过尖周牙槽骨、穿破黏膜排脓外，对于根管粗大或根尖孔也较大的牙可经龋洞排脓；有牙周炎的患牙也可经深的牙周袋排脓。但后两种情况均少见。

二、慢性尖周炎(chronic periapical inflammation 或 chronic apical periodontitis)

慢性尖周炎是指根尖孔周围组织的慢性炎症，发病原因与急性尖周炎相似，主要由牙髓炎、牙髓坏死以及急性尖周炎转变而来，根据临床症状和组织病理学的特征又可分为以下几种类型。

1. 慢性尖周脓肿(chronic periapical abscess)：又称为慢性牙槽脓肿(chronic alveolar abscess)，是发生在尖周部的慢性化脓性炎症，可由急性牙槽脓肿症状缓解后转化而来，但大多为尖周肉芽肿的中央坏死、液化形成脓肿而来。病理学上见尖周部骨组织和牙骨质有吸

收和破坏，肉芽肿形成。尖周部肉芽肿中央部分细胞坏死、液化形成脓液，周围主要是中性粒细胞、巨噬细胞，外有密集的淋巴细胞和浆细胞浸润。有时可见脓腔周围有炎性纤维结缔组织包绕。有的慢性尖周脓肿可见脓液经窦道排出，根据窦道排脓的部位有，口腔黏膜窦道、皮肤窦道、上颌窦道、鼻腔窦道等。

2. 尖周肉芽肿(periapical granuloma)：是慢性尖周炎中最常见的一种情况，当尖周组织的炎症程度较轻、较局限时易发生。尖周肉芽肿一般无自觉症状，相应的患牙一般无活力，但也可在有活力牙髓下发生尖周肉芽肿。由于与牙尖周部附着的肉芽组织外面有纤维组织包绕，使之与尖周的骨组织分隔，因而拔除患牙时可将肉芽组织与牙同时拔出。显微镜下观察：出现尖周肉芽肿的牙髓组织多已坏死，尖周部牙槽骨被炎性肉芽组织所取代。病变区有淋巴细胞、浆细胞、巨噬细胞浸润，可见血管内皮细胞和成纤维细胞增生，新生的毛细血管常衬以肿胀的内皮细胞。当巨噬细胞吞噬大量脂肪颗粒后可形成泡沫细胞。肉芽组织周围有纤维组织包绕，与周围组织分界清楚。有的肉芽肿中心可发生坏死，有时肉芽肿内还含有条状、团块状或网状上皮组织。这些上皮主要来自牙周膜中的马拉赛上皮剩余，但也可由窦道或牙周袋的上皮长入尖周肉芽肿内。在病变中还可见到胆固醇结晶体溶解后留下的梭形、针形的透明裂隙。

尖周肉芽肿可以保持相对稳定状态，维持较长时间，但当局部和身体抵抗力发生变化时可表现为反复发作，临床上常有反复疼痛、肿胀的病史。尖周肉芽肿也可转变为尖周囊肿或导致致密性骨炎的形成。

三、尖周囊肿(radicular cysts)

尖周囊肿是由牙根尖周组织炎症所引起的，几乎大部分都是由尖周肉芽肿转变来的。真正的囊肿是有上皮衬里的，但有时尖周肉芽肿中央液化可出现类似囊肿的情况。尖周囊肿一般与一个死髓牙相连，临床上多无自觉症状，可有叩痛。由于囊肿内组织液和水肿液的聚集以及周围骨组织被压迫吸收，因此尖周囊肿的体积可以比尖周肉芽肿的体积稍大，平均直径为 1～2 cm。对于尖周囊肿的形成机制，目前认为是由于牙周膜中的马拉赛上皮剩余在炎症刺激下增殖，然后增生上皮的上皮团块中央由于缺乏血供而变性坏死，形成小囊腔；此外，尖周囊肿也可由于增生的上皮沿着肉芽肿内的液化腔壁增生，并覆盖液化腔表面而形成囊肿。

镜下观察可见囊肿的壁由纤维结缔组织构成，囊壁表面衬有无角化的复层鳞状上皮。囊壁中有慢性炎细胞浸润，主要有浆细胞、淋巴细胞、组织细胞和泡沫细胞。囊肿的衬里上皮由于炎症刺激增生而形成上皮钉突或呈网状。有时上皮衬里不完整，部分与上颌窦相通的囊腔表面可衬有呼吸道的假复层柱状纤毛上皮。部分囊壁内有胆固醇结晶体的聚积，在镜下表现为针形裂隙，在裂隙周围可见大量吞噬细胞。有时囊壁衬里上皮可见一些细长、嗜酸性均质样物，这些透明小体又被称之为 Ruston 透明小体，来源和意义尚不十分清楚。

四、致密性骨炎(condensing osteitis)

致密性骨炎以往又称为硬化性骨炎(sclerosing osteitis)、局灶性硬化性骨髓炎(focal sclerosing osteomyelitis)。在轻度慢性炎症持续刺激下，尖周组织尤其是相应部位牙槽骨增生，使局部骨小梁变得不规则、致密，骨髓组织很少。致密性骨髓炎多发生在死髓牙、残根或咬

合创伤牙齿的尖周周围。由于这是根尖周组织对慢性刺激的一种反应性增生,所以多发生在年轻人中,下颌牙常见。

(金 岩)

参考文献

1. Kerr DA, Ash MM. Dental pulp disease, In : Oral Pathology . 4th Edi . Lea Li Febiger. Pholadelphia. 1978;205
2. 高志荣、史俊南、肖明振. 牙周病变程度与牙髓病理改变的关系——111 例牙周炎患者的临床与组织学对照研究. 中华口腔科学杂志. 1984;19(4):196
3. Thesleff I, Partanen AM, Kuusela P, et al. Dental papilla cells synthesize but do not deposit fibronectin in culture. J Dent Res. 1987;66(6):1107
4. 蔡文琴、王伯云. 实用免疫细胞化学. 四川科学技术出版社. 1988;38
5. Torabinejad M, Walton RE. Pulp and periapical pathosis . In: Walton RE and Torabinejad M, Principles and practice of endodontics . W. B. Saunders Company. 1989;29
6. 吴补领、史俊南、王多宁. 牙髓炎超氧化阴离子自由基的测定分析. 实用口腔医学杂志. 1990;6(增刊):228
7. 武忠弼主编. 病理学. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社. 1991;1
8. 成令忠主编. 组织学与胚胎学. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社. 1991;2
9. 吴补领. 自由基生物与口腔疾病. 国外医学 口腔医学分册. 1991;18:195
10. Jepsen S, Schiltz P, Strong DP, et al. Transforming growth factor - β1 mRNA in neonatal ovine molars visualized by in situ hybridization . Arch Oral Biol. 1992;137:653
11. 李秉琦. 超氧自由基、超氧化物歧化酶与口腔疾病. 实用口腔医学杂志. 1992;8(3):173
12. 杨连甲、金岩、胡蕴玉主编. 口腔和骨科的生物活性材料:原理. 应用. 进展. 西安:陕西科学技术出版社. 1993;61
13. 郑麟蕃、吴奇光. 口腔病理学. 上海科学技术出版社. 1993;175
14. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine . 1993;4:679
15. 郑麟蕃、吴奇光. 口腔病理学. 上海科学技术出版社. 1993;177
16. 吴补领综述. 超氧化物歧化酶与口腔疾病的关系. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1993;3(1):61
17. Arys A, philippart C, Dourov N. Micrordiography and light microscopy of mineralization in the pulp of undemineralized human primary molars . J Oral Psthol Med. 1993; 22:49
18. Soames JV and Southam JC, Disorders og the dental pulp . In: Oral pathology. Znd Ed: Oxford University Press. 1993; 49
19. 蔡文琴、王伯云主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术. 成都:四川科学技术出版社. 1994;310
20. 金伯泉主编. 细胞和分子免疫学. 世界图书出版公司(西安). 1995;335
21. 张亚庆、肖明振、杨永进. SOD 复合氢氧化钙切髓术的实验研究. 牙体牙髓牙周病学杂志. 1995; 5:146
22. 于世凤主编. 口腔组织病理学. 第 4 版,北京: 人民卫生出版社. 2000
23. 史俊南. 现代口腔内科学. 高等教育出版社. 第 1 版, 北京:2000
24. 金岩主编. 口腔颌面组织胚胎学. 陕西科技出版社. 2002

第十一章　牙髓药物学

牙髓药物学主要研究牙髓病和尖周病治疗过程中的药物应用，由于牙髓病、尖周病变通常都伴有感染，因此抗感染是牙髓用药的主要目的。另外，为减轻患者的疼痛，缓解患者的焦虑、畏惧情绪，治疗中使用镇痛药和抗焦虑药也将是今后牙科治疗的一个趋势。因此牙科医生必须充分了解药物的作用和机体对药物的反应，掌握适应证和禁忌证，药物的副作用、毒性、半衰期以及药物之间的相互作用，以便做出合理的选择。

药物治疗包括局部用药和全身用药，局部用药即根管内用药，是牙髓治疗中的常规用药方式，也是主要的用药方式；全身用药为辅助用药方式，应根据患者的具体情况而定。

第一节　根管内用药

根管内感染通常是以厌氧菌为主的混合感染。进行根管治疗术时，当根管预备结束后，根管内的细菌、坏死牙髓组织和根管内壁的感染物，大部分已被去除，但牙本质小管深层和根管侧支等器械和冲洗液达不到的微细结构内还有残余的细菌，此时就需要应用药物进一步控制微生物，缓解疼痛，减少尖周组织的炎性渗出。根管内用药（intracanal medication）就是指根管治疗术过程中在根管内使用的所有药物，包括根管冲洗剂、根管消毒剂和根管充填剂。

一、根管内用药的理想性能

（一）有广谱且强有力的杀菌作用，毒副作用小。

（二）渗透力强，以便能达到牙本质小管和根管侧支内。

（三）作用时间较长，一般要求在 24 h 以上。

（四）必须有足够的浓度，而且药效不因接触脓、血等减弱。

（五）对尖周组织无明显的刺激和损害。

（六）不会造成牙齿变色。

（七）贮存和使用方便。

（八）成本价格可为大众所接受。

二、根管内用药的作用

（一）破坏病原微生物

为了进一步消灭或控制根管预备后残留在根管系统内的细菌，在根管内放置药物，这些药物大致分消毒防腐类和抗生素类。防腐类药物通过使蛋白质凝固、变性或干扰微生物的酶系统等机制对病原微生物进行破坏，例如常用的甲醛甲酚合剂、樟脑酚合剂、木馏油等。抗生素类药物能通过抑制细胞壁、核酸或蛋白质的合成而破坏病原微生物，例如灭滴灵、红霉素、青霉素等。

(二)止痛

疼痛是造成患者身心痛苦的主要原因,也是导致牙科畏惧症的主要原因之一,因而有效地控制疼痛是患者和术者最关切的问题。疼痛既可能来自就诊前的炎症,也可能来自根管预备后因器械、冲洗液对尖周组织的理化刺激。不论来源如何,都应通过引流或某些药物获得减轻。常用的药物有各类抗生素和糖皮质激素类药物,例如氢化可的松、强的松龙、地塞米松等。还可用丁香油酚或樟脑酚等温和的药物安抚受到激惹的尖周组织。

(三)控制渗出

根管内不断有渗出液,说明尖周组织仍有活动性的炎症,只有控制了尖周的炎性渗出,根管的严密充填才有保障,才能降低根管治疗术后疼痛的发生率。控制根管渗出常用的药物有碘仿糊剂或氢氧化钙糊剂。

(四)诱导根尖发育完成

年轻恒牙根尖发育尚未完成,如果牙髓坏死,根尖发育将停止在某一阶段,与发育完成后的牙相比,根尖孔明显大而解剖牙根短。遇到这种情形,可用氢氧化钙糊剂充填根管,通过钙离子等作用,诱导根尖发育完成。

(五)其他

牙根折裂、髓室底或根管旁穿时,如果不严重,有望借根管内封药促进骨样组织即骨痂(callus)形成。

三、根管内用药的种类

根管内药物按作用分为根管冲洗剂、根管消毒剂和根管充填剂3类,但交叉比较多。如果按化学上分类会更清楚一些:

(一)苯酚类

苯酚类药物(phenolum)可引起蛋白变性、沉淀和胞浆膜通透性改变,从而产生抑菌或杀菌作用,同时具有一定的麻醉效应。高浓度的苯酚制剂有刺激性和腐蚀性。苯酚类药物作为控制细菌微生物的传统药物,长期广泛地用于临床,其中苯酚、甲酚、对氯苯酚分别为临床常用的樟脑酚、甲醛甲酚、樟脑氯酚薄荷合剂等根管消毒剂的基本成分。

1.甲醛甲酚合剂

甲醛甲酚合剂(formocresol, 简称FC)又名甲醛三甲酚合剂(formalin tricresol),1905年由Backly首先用于牙髓治疗。甲酚有邻位、间位和对位3种同分异构体,其中间位甲酚作为防腐剂最为有效。根管消毒剂所用的通常是3种同分异构体的混合物,称为三甲酚。甲酚可导致蛋白质变性、沉淀和胞浆膜通透性改变,从而发挥抑菌杀菌作用,甲醛则有与蛋白质中的氨基结合而凝固蛋白的烷基化作用,因此是作用力最强的根管消毒剂。有些学者认为甲醛具有潜在的抗原性,可作为半抗原与牙髓、尖周组织的宿主蛋白结合,形成免疫原,引起机体免疫反应,FC对尖周组织有毒害作用,还有遗传毒理学实验和动物致癌实验发现甲醛具有致突变和致癌性,故提出FC应停止使用。目前,国外已很少使用FC,在国内仍被广泛使用,但随着消毒药物研究的不断深入,FC的使用也在逐渐减少。为了减轻FC对尖周组织的刺激,使用时可将蘸有FC的小棉球以另一个棉球吸干后置髓室中。

2.樟脑酚合剂

樟脑酚(camphor phenol, CP)在酚类合剂中是毒性小、作用温和、有较好镇痛作用和一

定抗菌作用的药物。苯酚或石炭酸的抗菌作用较强，作为一种原浆毒，1%～2%苯酚即有杀菌效果，苯酚以液化形式存在于樟脑酚中，可以减少酚的腐蚀作用，缓慢释放，达到根管消毒目的。

3.樟脑氯酚薄荷合剂

对位氯酚兼有氯和酚的作用，故杀菌作用强，但刺激性也较大。加入樟脑，研磨成液体后，刺激性减少，使用也方便。薄荷脑除有镇痛作用外，还可使樟脑氯酚减少沉淀，并使合剂有一定的黏稠性。樟脑氯酚薄荷合剂的杀菌力强，不凝固蛋白质，刺激性较小，樟脑和薄荷脑均有较好的镇痛作用，可用于安抚。

4.木馏油

木馏油(wood creosote)为酚及其他酚类衍生物组成的混合物，从木焦油中分馏而得。愈创木酚(甲基邻苯二酚)和邻苯二酚的甲醚为木馏油的主要成分(60%～90%)。木馏油为淡黄色液体，有特殊气味，消毒能力比 FC 差，有一定的镇痛作用，对尖周组织刺激性较小。该药物的优点是：遇脓、血、坏死有机物时仍有消毒作用。

5.丁香油酚

丁香油(clove oil)是丁香花蕾蒸馏时提取的挥发油，有效成分是丁香油酚(eugenol)。丁香油酚系无色或淡黄色液体，溶于乙醇。有镇痛和麻醉作用，刺激性小，用于化学性、机械性尖周炎或活髓拔除后封入根管，有较好的安抚止痛作用。

6.醋酸间苯酸酯

醋酸间苯酸酯(cresatin)是一种无色的油状液体，有芳香味，有镇痛作用，消毒作用较差。

（二）氢氧化钙

氢氧化钙(calcium hydroxide)因其高 pH 值而具有较强的抗菌性能，能完全抑制细菌的繁殖。放置根管内 7 d，仍能杀死根管内的大部分病原微生物。氢氧化钙还能有助于溶解根管预备后残留的有机物质。实验表明：氢氧化钙优于樟脑氯酚、樟脑酚、多种抗生素和抗生素与类固醇复合制剂。因此，目前认为氢氧化钙是比较理想的根管消毒药物。

氢氧化钙还可促进碱性磷酸酶的活性和尖周结缔组织细胞的分化，使根管侧壁沉积类牙骨质和类骨质，延长牙根，封闭根尖孔；若根尖端的管腔内残留牙髓，氢氧化钙则可诱导骨样牙本质、管样牙本质的沉积，使继续发育的牙根结构更加完善。

鉴于氢氧化钙的生物学效应，它既是控制根管内感染的药物，又是牙根继续发育的诱导剂，是目前诱导根尖形成的首选药物，各家报道的成功率不等，约在 74%～96%之间。其商品制剂有 Calvital、Dycal、Calxyl、Pulpdent 等。但是，临床应用有一定困难，它难以充填至根尖或难以充填密合。而且，氢氧化钙是容易被吸收的制剂，若尖周炎症未能控制，吸收后炎性结缔组织进入根管，反而会影响正常的根尖修复。故氢氧化钙在根尖诱导成形术中的应用有一定的局限性。

（三）卤素类

口腔科常用的卤素类药物有氟、氯和碘 3 种，卤素类根管消毒剂通过卤化与氧化菌体原浆蛋白活性基团杀菌，作用快而强。用于根管消毒的有效成分是含碘、氯的化合物，氯较碘的抗菌作用更强。

1.次氯酸钠液

次氯酸钠液(sodium hypochlorite)是欧美牙科诊所最常用的根管冲洗液,从1936年起开始在口腔科使用。它除有很强的消毒灭菌作用外,还有溶解有机物的作用。但因其腐蚀力较强,使用时,一定要用橡皮障保护患者的口腔软组织和皮肤,术者也要戴橡皮手套和面罩。超声器械根管预备时,器械振荡溅起的飞沫,也不能忽视。次氯酸钠液为2%漂白粉、0.4%硼酸和1.4%碳酸钠的水溶液,漂白粉对细菌、芽孢、病毒均有杀灭作用,这是由于生成了不解离的次氯酸(HOCl),而次氯酸能够氧化原浆蛋白的活性基团。次氯酸一旦与组织接触,很快形成氮、甲醛和乙醛。这些物质使肽链断裂,蛋白质溶解。在这一过程中,氨基(-HN)中的氢被氯取代形成氯化胺,氯化胺具有重要的抗菌作用。提高温度可加强次氯酸钠的抗菌效果。0.5%和5%次氯酸钠液尽管浓度差为一个数量级,但体外试验表明其抗菌效果无明显差别。因此,从安全角度出发,现多主张用低浓度的次氯酸钠液。从近20年的文献报道中,可看出以浓度为0.25%~0.50%的次氯酸钠液常用。但低浓度溶液的活性会快速下降,因此缩短稀释和使用之间的时间,使用时应大量反复冲洗以及时补充次氯酸。而用3%~5.25%次氯酸钠液,pH值10~12时,能更有效地溶解残余的坏死组织。通过游离出来的氯溶解残余坏死组织,其碱性基质可溶解蛋白质并皂化脂肪,使牙本质碎屑乳化,同时还有润滑作用,有助于机械性扩大根管。

2.氯胺-T

氯胺含有效氯12%。氯胺缓慢释放活性氯形成次氯酸,同时本身可能直接产生杀菌作用,由于氯胺释氯速度缓慢,故刺激性较小,杀菌效力也较小,优点是杀菌作用的持续时间较长。

3.碘酊

碘酊(iodine tincture)是碘和碘化钾溶于乙醇而成,能氧化病原体原浆蛋白的活性基团,并能与蛋白质的氨基结合而使其变性沉淀,有强大的杀灭病原体作用。但值得注意的是碘可以充当半抗原,有些患者对含碘化合物过敏。常用于根管治疗术的是碘酊、碘化钾碘酊和碘仿,其毒性和组织刺激性低,可作为根管消毒药物成分。

4.碘仿

碘仿糊剂是一种比较常用的根管内药物,目前常用的Vitapex糊剂即以碘仿为主要成分,常用来治疗难治性的病例,虽然其根管内用药的药效和持续时间还有待于进一步研究,但通过临床病例的观察,其减轻临床症状,促进窦道愈合的效果是可以肯定的。

(四)醛类

醛类与蛋白质中的氨基结合,使蛋白质变性沉淀,其杀菌作用大于醇类。对细菌、芽孢、病毒均有效。醛类中以甲醛作用最强,可配制成甲醛甲酚合剂用于根管消毒。戊二醛(glutaraldehyde, GD)是一种五碳醛,高温、中性或碱性环境都能使戊二醛发生聚合而失去醛基,并降低交联能力。它为蛋白质固定剂,有两个醛基与蛋白质反应结合牢固,不可逆转。戊二醛对G^+和G^-菌、真菌、病毒、芽孢等都有杀灭作用,杀菌持续时间长,将pH调至8.5时可增强杀菌效果,并可维持两周。作为根管消毒剂,戊二醛可封闭牙本质小管和根尖孔,阻止根管内的病原微生物对尖周组织的危害。它的分子一般不逸出根尖孔,因而不会造成尖周组织炎症。它还可使无机物溶解,软化牙本质碎屑。

(五)氧化剂类

氧化剂与有机物相遇时放出新生氧,通过氧化细菌体内活性基团而发挥杀菌作用。临

床最常用的是3%过氧化氢液(hydrogen peroxide),过氧化氢遇到组织中的过氧化氢酶时立即分解,释放出新生氧而发挥杀菌和除臭作用,对以厌氧菌为主的根管内感染尤为适用。骤然产生的气泡使液体的体积迅速增大,溢出根管口,这一过程的明显好处是可将根管深处的污物带出根管,有良好的机械清洗作用,而且少量氧气气泡对毛细血管的压力,有一定的止血效果。但作用时间较短,仅在产生气泡时有效,且受有机物影响,因此杀菌作用有限。用带弯针头注射器冲洗根管时,压力不要过大,以免大量液体冲出根尖孔,骤然产生大量气泡,造成化学性尖周炎,导致术后疼痛,严重时还会导致皮下气肿。

3%过氧化氢液要注意密闭和在阴凉处存放,以防过早分解失效。

(六) 抗生素类

许多抗生素都可用于根管消毒,例如强力霉素、金霉素(aureomycin)、螺旋霉素(spiramycin)、土霉素(terramycin)、红霉素(erythrocin)、四环素(tetracyclinum)、青霉素(penicillin)、链霉素(streptomycin)、制霉菌素(nystatin)和甲硝唑(metronidazole)等,多以合剂形式用于RCT,可用生理盐水、丁香油或樟脑氯酚薄荷合剂调拌成糊剂后使用。例如红霉素加灭滴灵就是目前应用较多的一种根管消毒用合剂。由于抗生素药效持续时间短暂,控释药物系统应运而生。

(七)双胍类

双胍类药物的抗菌作用主要是由于其结构中的疏水基团与亲水基团,可分别渗入胞浆膜的类脂质层和蛋白质层,从而改变细菌胞浆膜通透性,使胞内物质外渗而发挥杀菌作用。有代表性的是洗必泰。洗必泰为强的广谱杀菌、抑菌剂,对 G^+、G^- 菌和真菌都有较强的抗菌作用。其主要优点是毒性低和刺激性小。0.05%的洗必泰为常用的根管冲洗剂, 0.1%的洗必泰可作为根管消毒剂。

四、根管内用药的方式

(一)根管冲洗

常用的工具是带弯针头的注射器,要求针头端部圆钝,使针头进入根管的深部后,逐渐加压,使冲洗液以较快的流速冲人根管。

(二)根管封药

挥发性液态药物,例如FC合剂,可用小棉球蘸上药物后置根管口。非挥发性液态药物,例如抗生素类药物,可用纸捻蘸药物后置根管内。非挥发性糊剂类药物,可用螺旋充填器或扩大针将糊剂送入根管的深部。如果是商品化的根管药物,常常是用注射器式的容器装填药物,使用起来非常方便,可以将糊剂直接送入根管内。另外,如果用根管药物控释系统,要根据临床需要选择贮库型或整体型系统并按要求用药。

(三)根管充填

根管充填如果仅仅是堵塞空腔效果往往不好,因为根管系统的复杂性决定了不可能完全堵塞,根管充填物中应含某些药物成分,才能使消毒作用得以延续,弥补根管预备和根管充填的不足。根管充填糊剂中必须含有抗菌成分,使根管充填材料具备根管持续消毒作用,促进尖周病的完全愈合。

(张　莹)

PDG

第二节　牙髓治疗中的全身用药

全身用药的目的在于控制感染、缓解疼痛、消除焦虑情绪。

一、控制感染

当感染物质被推出根尖孔时，或对于免疫力低下的患者，为避免感染扩散，均应考虑采取抗生素治疗。在此主要讨论口腔科常用的口服抗生素的用法。

(一)分类

抗生素可分为两大类：迅速杀灭细菌的抗生素和通过阻止细菌蛋白合成，缓慢杀死细菌的抗生素。一般情况下，快速杀灭细菌的抗生素更为理想。

1.杀菌型抗生素：指能快速杀灭细菌的抗生素，例如青霉素类、头孢菌素类、甲硝唑、氟喹诺酮类，通常被用于杀灭牙髓病原菌。前两者通过螯合或削弱新形成的细胞壁来杀菌，甲硝唑则通过阻止 DNA 合成来杀菌。口服用量如表 11.1。

表 11.1　杀菌型抗生素用量

药名	用药剂量	每日服用次数
青霉素	500 mg	4 次/d
氨苄青霉素	500 mg	4 次/d
阿莫西林	500 mg	3 次/d 或 4 次/d
头孢氨苄	500 mg	4 次/d
头孢羟氨苄	500 mg	4 次/d
头孢呋辛	250 mg 或 500 mg	2 次/d
头孢克洛	500 mg	3 次/d

它们均需要有活跃生长的细菌才能发挥效力，因此通常不与抑菌型抗生素联用。

2.抑菌型抗生素：有红霉素类(大环内酯类)、氯林可霉素、四环素类。

(二)各种抗生素的药理

1.青霉素类

青霉素抗菌谱较广，对 G^+、G^- 菌都有杀菌作用。青霉素类的半衰期很短，只有约 1 h。因此使用时应按时服药。青霉素通过肾脏排泄，并可以在肾脏聚集，达到很高的杀菌浓度，对治疗尿道感染有效。但对肾功能低下的患者应适当减少用药量。

青霉素类几乎无任何毒性，也就是说，如果患者不过敏，青霉素没有最大用药剂量，过量的青霉素也没有副作用。阿莫西林由于易于被肠道吸收，通常被视为首选的青霉素。

2.头孢菌素类

头孢菌素为一族广谱半合成抗生素，具有抗菌谱广、抗菌作用强、耐青霉素酶、临床疗效高、毒性低、过敏反应比青霉素少等优点。头孢菌素类可分为四代。第一代头孢菌素在牙科中的应用价值最大，因为它们能杀死大部分的口腔病原菌，因此大多感染情况应考虑使用第一代头孢菌素。第二代、第三代和第四代头孢菌素用于难控制的感染，但需要获得实验室培养结果之后使用。口服头孢菌素的发展落后于注射用头孢菌素。如果病情严重的患者对口服药物治疗无反应，应考虑住院治疗，并给予静脉注射抗生素治疗。

口服青霉素类和头孢菌素类抗生素极少产生严重的致命性过敏反应。如果患者对一

种青霉素过敏，那么他可能对所有的青霉素类都过敏，并且对青霉素过敏的人中有 1/10 对头孢菌素也过敏。

3.硝基咪唑类

硝基咪唑类药物能抗多种厌氧的 G^+、G^- 菌和原虫的活性。甲硝唑杀菌迅速，它能攻击细菌的 DNA，对抗专性厌氧菌，但不能对抗兼性厌氧菌和需氧菌。甲硝唑常与阿莫西林联用来抗击幽门螺杆菌。这两种快速杀菌药的联用也有利于严重的牙源性感染的治疗。牙周病学家发现：甲硝唑有助于杀灭深牙周袋中的厌氧菌。

甲硝唑的半衰期为 8～10 h，副作用以消化道反应多见。因甲硝唑可抑制酒精代谢，因此服用甲硝唑的患者应注意服药后一天内不要饮酒。

替硝唑为新一代 5－硝基咪唑衍生物，具有较强的抗原虫和抗厌氧菌作用。与甲硝唑相比，具有服药后血药浓度高，半衰期长，有效浓度持续时间长等优点。

4.大环内酯类

红霉素通过减缓细菌蛋白合成来杀菌，而不改变人类蛋白质合成的速率。由于分子量较大，红霉素也被称为大环内酯类抗生素（表 11.2）。大环内酯类抗生素可杀灭许多 G^+ 的细菌，而只对少量 G^- 的细菌有效。虽然杀菌方式不同，但它们的杀菌谱与青霉素类相同，因此对青霉素过敏的患者可选择红霉素类药物。抗菌谱广的新的大环内酯类药物阿齐霉素和克拉霉素，对牙科感染更为有效。但最近发现，大环内酯类抗生素与其他药物存在交叉反应，因此用药时应谨慎。大部分红霉素类药物的半衰期为 1～2 h，而新开发的红霉素类药物活性时间较长，克拉霉素的半衰期为 6 h，阿齐霉素的半衰期可长达 40 h。红霉素的副作用主要是能加快胃肠蠕动从而引起胃痉挛。

表 11.2 大环内酯类抗生素

药名	用药剂量	每日使用次数
红霉素	250～500mg	4 次/d
红霉素硬脂酸盐	250～500mg	4 次/d
克拉霉素	250～500mg	4 次/d
阿齐霉素	500mg	2 次/d，服用 1d，之后 1 次/d

5.抗生素使用中的注意事项

使用抗生素类药物时，应注意在症状解除后需继续服药 2～3 d。理论上说，当抗生素水平降到杀菌浓度以下时，如果仍有活菌存在，此时更易引起细菌突变。一旦症状消除，患者通常就不再继续服药。因此有必要让患者了解坚持服药的必要性。

当患者对口服抗生素无反应时，应考虑住院治疗给予静脉滴注抗生素。许多新一代的抗生素只能采取非肠道静脉注射方法给药，持续的静脉给药使血药浓度达到一个较高水平，可以避免口服给药中因半衰期和患者依从性导致剂量变化从而引发的并发症。

6.抗生素的预防作用

口腔科治疗过程中释放的口腔细菌能够引起心脏和人造关节感染，尤其是口腔链球菌，因此对一些心脏病患者和植入人造关节的患者在口腔科治疗术前应使用抗生素；患有影响免疫功能的全身性疾病的患者也应考虑给予预防性抗生素；服用减肥药“氟苯丙胺－芬特明”的患者，由于这些药物具有导致心脏瓣膜缺损的倾向，也应采用抗生素治疗。

二、控制疼痛

控制疼痛的药物有 3 类：

第一类是麻醉药，最为有效，它们在大脑中有三种类型的受体。

麻醉药属于中枢神经系统镇静剂，能致瘾，其致瘾特征为既有生理上的也有心理上的成瘾，故应慎用。麻醉药通常与对乙酰氨基酚或阿司匹林和非甾体抗炎药联用以提高药效，使用麻醉药的患者不能开车或操作机器。临床使用的麻醉药包括丙氧芬、可待因、氢可酮、哌替啶、吗啡和曲马朵等。

第二类是阿司匹林和非甾体抗炎药，它们在损伤部位发挥作用，通过减少疼痛引发的受损细胞内前列腺素的合成来达到镇痛效果。阿司匹林多年来一直是牙痛的常用药，现在仍然很有效。但由于它能延长出血时间，一般不作术前给药。它的抗凝机制在于干扰血小板的形成。因阿司匹林对胃有刺激性，故对于有胃病的患者，应考虑使用有包被的阿司匹林，或使用含镁、钙、铝化合物的阿司匹林，利用化学物质的缓冲作用，以减轻胃部不适。

布洛芬目前被认为是最安全的非甾体类抗炎镇痛药，与阿司匹林相比，解热作用较优，镇痛作用相当或较优，抗炎作用更突出。口服吸收好，血药浓度 1 ~ 2 h 可达高峰，生物利用度高，半衰期为 2 ~ 2.5 h。许多疼痛研究表明，非甾体抗炎药缓解疼痛的效果优于 60 mg 可待因。它们也可以在颌骨局部注射，对缓解去髓术的术后疼痛有良好的效果。非甾体抗炎药和阿司匹林均可引起胃部不适，易导致溃疡。

第三类药物是对乙酰氨基酚，商品名为扑热息痛，它通过直接作用于大脑中的一个未知位点来缓解疼痛。对乙酰氨基酚对疼痛和发热有效，但不能抗炎。有些医生将对乙酰氨基酚和阿司匹林每隔 2 h 交替使用以增强镇痛效果。有研究表明对乙酰氨基酚能提高锐痛的痛域，如牙科治疗的疼痛，效果优于其他类型的镇痛药。对乙酰氨基酚对胃没有刺激，但应谨慎用于肝病患者或慢性饮酒的患者。

三、缓解焦虑

许多患者因害怕疼痛而回避牙髓治疗，甚至有些患者会出现牙科畏惧症（dental fear，DF），也称牙科焦虑症（dental anxiety，DA），表现为对牙科诊治过程或其中某些环节的害怕，出现烦躁不安、心悸、出汗等交感神经系统机能亢进的症状。近期的一项研究表明，将近 30% 的被调查者说他们对看牙感到很紧张，多数人认为如果给予镇静剂，他们会更乐意接受治疗。

目前对抗焦虑的药物主要是苯并二氮卓类，它直接作用于大脑中枢控制恐惧的区域。这类药物不仅能缓解焦虑，还是抗惊厥药、遗忘剂、镇静剂和肌肉松弛药。

首先发现的苯并二氮卓类药物是安定。它的半衰期长达 60 h，并且在这期间均具有效力。其原因是它的两个代谢产物均具有药理活性。氯羟去甲安定，就是安定的代谢产物，它的半衰期是 14 h。

口服给药应在诊室进行以便于监控，并应在治疗之前 1 h 给药。对于中枢神经系统镇静剂，当患者目前正在服用其他中枢神经系统镇静剂时应考虑减少剂量。

（王　英）

参考文献

1. Tronstad L. Extraradicular endodontic infections. Endodont Dent Traumatol. 1987;3:86
2. Heimdahl A, Hall G, Hedberg M, et al. Detection and quantitation by lysis－filtration of bacteremia after different oral surgical procedures. J Clin Microbiol. 1990;28:2205

3. Hammarstrom L, Blomlof L, Anderson L, Lindskog S. Replantation of teeth and antibiotic treatment. Endod Dent Traumatol. 1996;2:51
4. Penniston SG, Hargreaves KM. Evaluation of periapical injection of ketorolac for management of endodontic pain. J Endod. 1996;22:55
5. Gatti J, Skobe Z, Dubeck JM, et al. Bacterial DNA in periapical lesions using two surgical techniques [abstract]. J Dent Res. 1997;76:58
6. Dajani AS, et al. Prevention of bacterial endocarditis. JAMA. 1997;277:1794
7. Advisory statement: antibiotic prophylaxis for dental patients with total joint replacements. J Am Dent Assoc. 1997;129:1004
8. Berthold CE, Corey SE, Dionne RA. Triazolam drug levels following sublingually and orally administered premedication [abstract]. J Dent Res. 1997;76:114
9. Ehrich DG, Lundgren JP, Dionne RA, et al. Comparison of triazolam, diazepam, and placebo as outpatient oral premedication for endodontic patients. J Endod. 1997;23:181
10. Carnes PL, Cook B, Eleazer PD, Scheetz JP. Change in pain threshold to sharp pain by meperidine, naproxen, and acetaminophen as determined by electric pulp testing. Anesth Prog. 1998;45:139
11. Dionne RA, et al. Assessing the need for anesthesia and sedation in the general population. J Am Dent Assoc. 1998;129:167
12. 史宗道. 口腔临床药物学. 第二版. 北京,人民卫生出版社,2003

第十二章　体外培养技术
——牙髓生物学研究的重要手段

第一节　体外培养牙髓、牙周组织的成纤维细胞

牙髓是疏松的胶原性结缔组织，由细胞和基质组成，承担牙齿的营养代谢、感觉和修复等方面的重要生理功能。然而，由于牙髓被牙体硬组织包围，进行体内研究存在许多困难，因此，体外培养牙髓细胞对于揭示牙髓生理活动和病理改变具有必要性。牙周膜是牙周组织的重要组成部分，成纤维细胞又是牙周膜的主要细胞成分，对于维持其内环境的稳定和发挥生理功能起重要作用，组织培养技术为探索和揭示牙周组织特性提供了良好的手段。随着体外组织培养技术的日臻完善，国内外已相继开展了牙髓等组织细胞的培养，并广泛应用于实验研究。现就近年来牙髓细胞等体外培养、培养细胞的超微结构以及培养细胞的冻存、复苏等方面的文献进行回顾。

一、体外培养牙髓、牙周膜、牙龈成纤维细胞

目前人们已培养了人、兔、大鼠、牛和猪等种属的牙髓细胞，其中大鼠的牙髓细胞已建株(RPC - C2A)。动物愈年轻，其牙髓细胞的活力愈高，易于培养成功。一般选用 6 ~ 8 周龄兔、2 周龄牛、180g 体重的大鼠。人一般选用年轻的恒牙，主要为因正畸拔除的前磨牙或因阻生拔除的第三磨牙。一般不主张使用麻醉药，因为麻醉药可以影响牙髓细胞的活力。对动物可采取断头法处死，直接获取牙髓；对人可以采用针麻法拔除牙齿，获得牙髓。拔除的牙齿应立即置于预冷的不完全培养液中，无菌条件下劈开牙齿，取出牙髓。在取牙髓的过程中，用含抗生素的不完全培养液或 PBS 缓冲液反复冲洗，减少污染。根尖部牙髓可能附有胚胎时期残留的牙囊组织，为了保证培养的牙髓细胞更接近成熟的牙髓组织，一般主张切除根尖部 2 mm 的牙髓组织。

牙髓细胞的原代培养有贴附法和消化法两种方法：贴附法是将牙髓组织剪切成 1 ~ 2 mm^3小块，贴附于培养瓶底面，瓶底向上，加适量培养液，37℃培养 2 h 后，翻转培养瓶继续培养。消化法是将牙髓组织小块(约 1 mm^3)置于 4 mL 的 PBS 缓冲液(内含 5 mg 胶原酶、4 mg 透明质酸酶、20 mg 胰蛋白酶)中消化，离心后获取细胞悬液，进行原代培养。Nakashima M(1991)采用消化法可从牙髓组织中培养出成纤维细胞、内皮细胞和成牙本质细胞样细胞等 3 种类型的细胞，但细胞经酶消化后损伤较大；而贴附法损伤小，细胞生物学特征较消化法稳定。陈筠(1989)成功培养了 Wistar 大鼠牙髓细胞，并分析了细胞的形态、生长速度、分裂指数和染色体数目等生物学特征。随后，张郁(1992)，吴军正、司徒镇中强、陈建元等(1993)采用组织块法培养了人恒牙牙髓细胞，成功率达 17.5%，细胞生长良好，形态典型。

牙周组织的培养是刮取牙根中 2/3 部位的牙周膜，牙龈组织是切取附着牙齿上的牙龈，分别切成 1 mm^3 左右的碎块，原代培养的贴附法和消化法与牙髓细胞相同。

常用培养基有 DMEM、RPMI 1640,对于牙髓细胞的培养,两者培养效果相近。培养基中加入胎牛血清制成完全培养液,培养条件为 37℃,饱和湿度,5% CO_2。细胞传代采用酶消化法,1:2 或 1:3 传代。

二、培养牙髓、牙周膜、牙龈细胞的生物学特征

(一)形态学观察

培养中的牙髓细胞大多呈梭形,胞体丰满,胞浆均匀,核圆,核仁清楚,牙髓、牙周膜、牙龈成纤维细胞之间形态上无明显差异。人牙髓等成纤维细胞从超微结构来看,具备一般成纤维细胞的特征。细胞内外有大量合成和分泌的成束的胶原纤维,丰富的微丝和微管构成了细胞骨架,细胞突起内有发达的胶原和微丝,亦可见聚集成堆的线粒体,提示细胞有很强的收缩能力。此外,细胞器很发达,线粒体常聚集成簇,位于胞核周围,呈短杆状、环状或弯曲成"蜡肠"状,双层膜结构完整,嵴呈板层或小管状;高尔基氏体分布于核的两端,其周围可见分泌小泡;胞浆中糖元较多,聚集在某一区域,大小均一,呈花瓣状。

(二) 细胞增殖

国外学者在原代培养时,常规在培养瓶底面涂布胶原或滋养层,这样有利于组织块的贴壁,并且组织块周围形成生长晕的时间较早,大大提高原代培养的成功率。其机制可能是细胞特异的亲和力受体与细胞间质结合,使细胞与胶原形成一个连续的整体,从而影响细胞的迁移和生长。牙髓组织块周围形成生长晕的时间各不相同,从 1 d 到 20 d,这可能与局部麻醉药和铺制滋养层等因素有关。目前多数学者认为:培养细胞第 4 代以后增殖状况良好,可以保证实验的重复性、可靠性。细胞传代后,其增殖情况基本上呈"S"形。传代后第 1 d 细胞生长缓慢,第 3 d 明显加快,第 6 d 达到高峰并趋于平缓。这可能是传代早期由于消化损伤,细胞处于休止状态,到第 6 d 细胞间出现接触抑制,开始是抑制细胞运动,并不抑制细胞分裂,细胞继续生长,直至一定密度才停止分裂,出现了密度抑制。实验应在细胞生长良好的阶段进行。

(三) 碱性磷酸酶

碱性磷酸酶是较为肯定的参与和促进钙化的酶类,分为肝型、骨型和肾型,牙髓组织碱性磷酸酶属肾型。牙髓组织、牙周组织、骨、肝、肾、小肠中碱性磷酸酶活性较高,而其他组织则比较低。因此,碱性磷酸酶活性可以作为体内牙髓细胞的一个指标。培养中的人牙髓细胞碱性磷酸酶活性与体内牙髓相当,比普通成纤维细胞(如牙龈成纤维细胞)高出 2~8 倍。这提示培养中的牙髓细胞在形态上与成纤维细胞类似,但还保持了体内牙髓细胞的基本生物学特性。

三、牙髓、牙周膜、牙龈成纤维细胞的冻存和复苏

细胞株或细胞系的超低温保存有许多优点:首先,可以避免每隔一段时间就要传代保种,消耗大量培养液,花费许多人力进行一系列繁复的操作;其次,由于频繁传代,有可能引起细胞遗传性状和生化特性的改变;最后,可以减少微生物污染的机会。吴军正等冻存人的牙髓、牙周膜、牙龈成纤维细胞均已成功。郝建军(1994)采用常规方法对人牙髓、牙周膜、牙龈成纤维细胞进行了冻存和复苏,并比较了冻存前后细胞的生物学性状。结果表明:对三种细胞早期冻存,其超微结构、增殖、染色体数目、表型、碱性磷酸酶合成、胶原和细胞外

基质的表达影响较小。

第二节 体外培养成牙本质细胞和相关干细胞

成牙本质细胞分化和牙本质形成的机制至今尚未完全明确。随着对牙本质－牙髓复合体研究的逐步深入，对成牙本质细胞的需求已极为广泛，但由于天然成牙本质细胞数量有限，而且成牙本质细胞属终末分化细胞，没有进一步分裂的能力，体外培养无法获得大量的单一的成牙本质细胞。在牙齿发育过程中，神经嵴来源的牙乳头（外胚间充质）细胞可以分化为牙髓成纤维细胞和成牙本质细胞。有学者从培养其前体细胞——牙乳头细胞入手，通过生长因子、激素等外源性刺激诱导细胞向成牙本质细胞方向分化，给解决这一问题带来了希望。近年来，随着成牙干细胞研究的深入，牙髓干细胞和外胚间充质干细胞(ecto－mesenchymal stem cell, EMSC)的发现也为成牙本质细胞的体外培养开辟了新的途径。

一、乳头（外胚间充质）细胞的体外培养

Thesleff I, Partanen AM, Kuusela P 等(1987)分离了 17 d 胎小鼠牙乳头组织，成功地培养了小鼠牙乳头（外胚间充质）细胞。随后，赵大为(1997)、郝建军、史俊南、牛忠英等(1997)，陈新梅(1998)成功地建立了人牙乳头细胞体外培养模型。他们利用从临床获得的合法水囊引产胎儿，分离牙乳头组织，采用组织块法和酶消化法（即 0.2%胰酶和 0.02% EDTA 在 37℃条件下消化 20 min）进行体外培养。结果显示：两种方法获得的细胞在传代和生长特性等方面相似；人牙乳头细胞易于从组织块中游出，原代培养成功率较高；细胞在形态上为成纤维细胞样，生长旺盛；细胞可稳定连续传代，冻存和复苏对细胞形态、生长状态和活性无明显影响；细胞在 DMEM 和 RPMI 1640 培养液中均能成功地进行原代和传代培养，DMEM 更有利于人牙乳头细胞在体外培养中的增殖和生长。

进一步的研究表明：人牙乳头细胞具有较强矿化能力，经矿化液（含维生素 C、β－磷酸甘油和地塞米松）诱导后，细胞复层生长而形成矿化细胞结节，出现与成牙本质细胞相似的超微结构特征和典型的矿化影像。实验采用酶消化法获取人胎儿的牙乳头细胞，根据培养液中所加药物的不同，分为三组：不加药的对照组、含 β－磷酸甘油(β－GP)加 Vit C 的 β－GP 组、含 Dex（地塞米松）加 β－GP 和 Vit C 的 Dex 组。结果发现：

1.两个加药组在细胞长满后 7d 左右，可观察到细胞复层生长，开始形成细胞结节。随着培养时间的延长，结节增大且数量增多。

2.Von Kossa 和茜素红 S 染色发现细胞结节均为阳性。

3.显微镜计数染色的细胞结节，Dex 组数量最多，其次为 β－GP 组，不加药组结节少，各组间有显著的统计学差异。

4.透射电镜下，Dex 组的牙乳头细胞胞浆中出现明显的基质小泡，致密针状晶体沉积在胶原纤维周围，β－GP 组亦可观察到基质小泡，但针状晶体较少且纤细。不加药组细胞内外胶原成分丰富，但没有观察到钙化的影像。

5.X 线能谱分析发现 Dex 组和 β－GP 组中细胞结节内钙、磷含量较周围细胞有显著增高，且钙与磷元素的原子重量百分比为 1.55:1，与牙本质的相同。

6.X 线衍射分析表明 Dex 组和 β－GP 组在 θ(31°～33°)处曲线平缓升高，提示有与牙本

质和羟基磷灰石晶体结构相似的微晶体形成。

7.Dex 组和 β-GP 组细胞内 ALP 和上清液中骨钙素的含量均比对照组高，但两组间无明显差异。

以上结果说明：培养液中不加 Vit C 则无矿化结节形成，细胞结节在含 β-GP 的培养液中能够矿化，地塞米松显著增加矿化结节的数目，且形成的结节在元素组成和晶体结构上与牙本质、羟基磷灰石相似。在激素作用下，人牙乳头细胞表达成牙本质细胞的某些表型。人牙乳头细胞形成的矿化结节对研究牙本质形成和成牙本质细胞分化很有意义。

二、牙本质细胞的体外培养及其永生化

学者们在体外培养成牙本质(细胞样)细胞方面进行了一些有益的探索。

有学者在 Millipore 滤膜上成功地培养了小鼠磨牙的成牙本质细胞样细胞，其中包括原始成牙本质细胞、前成牙本质细胞和其他牙髓细胞。这种滤膜复合了 NCPs 和牙齿生物基质，或在培养液中加入硫酸软骨素或透明质酸。但用胶原或 Fn 处理滤膜进行培养没有成功。放射自显影分析证明 GAG 可以维持成牙本质细胞的极化状态，但并不启动新的成牙本质细胞的分化。最近有学者将含有前期成牙本质细胞的牙乳头组织置于复合了肝素、Fn、TGF-β 或 BMP-2 半固体培养基中培养，可以刺激细胞极化和功能性成牙本质细胞样细胞的分化。

Nakashima M(1992a,1992b)发现骨和牙本质的 BMP 粗提物与生长因子一样，刺激体外培养的原代牛牙髓细胞 DNA、蛋白多糖和骨钙素的合成，抑制碱性磷酸酶(ALP)的合成，这些分裂和诱导效应取决于细胞分化的状态 。

Bouvier M, Joffre A, Magloive H(1990)将人牙髓细胞接种于 Ⅰ 型胶原和硫酸软骨素制成的凝胶体中，细胞表达成牙本质细胞的表型并且出现钙化现象，但没有前期牙本质的合成。生长于包被玻片上的牙髓细胞，在生物合成方面发生了变化(Fn 合成受抑制，但维持分泌 Ⅰ 型胶原)，黏附了微晶的人牙髓细胞显示出正在分化的新成牙本质细胞的特征。值得注意的是大量的 Fn 包绕于结晶周围，并在氢氧化钙结晶和其黏附的细胞之间形成了一个界面。

建立稳定的、克隆化的、具有成牙本质细胞生物学表型和功能的细胞系是牙髓细胞生物学重要的研究内容。Hanks CT, Rang D, Sun Z 等(1998)取材 18~19 d 胎龄的 CD-1 小鼠下颌第一磨牙胚牙乳头组织，胰酶消化法培养原代细胞，按 3T6 法进行细胞的传代培养以使细胞永生化，传 28 代后，克隆得到自发性永生化细胞系 MDPC-23，具有一些成牙本质细胞的特性，如高 ALP 活性、表达牙本质磷蛋白(dentin phosphoprotein 或 phosphophoryn, DPP)和牙本质涎蛋白(dentin sialoprotein, DSP)。Thonemann B, Schmalz G(1998)机械剥离 6 月龄小牛的磨牙胚牙乳头组织，用胶原酶和透明质酸酶消化法作原代培养，采用电穿孔法将 pSV3neo(含 SV40 大 T 抗原)导入第二代细胞，G418 筛选 15 代后，有限稀释法获得四个克隆，表达原胶原 α1、Ⅰ 型胶原和 DPP，表明为成牙本质细胞样细胞。该细胞系已传 82 代，约 1.5 年(据文献发表时的报道，以下同)。相应的，他们转染了 pUC18 LCR E6-E7(含 HPV18 E6/E7)至原代细胞，第 15 和 17 代时采用有限稀释法进行细胞克隆，目前有一个克隆(tCPC E)已渡过 M_1 期和 M_2 期，共传 75 代，约 1.5 年。MacDougal M, Thicmanm R, Ta H 等(1995)用崩解酶(dispase)分离 18 d 的 Swiss 小鼠下颌第一磨牙胚的成釉器和牙乳头，然后采用胰酶

消化法培养原代牙乳头细胞和/或成牙本质细胞，再将 pZIPtsa58 - Neo - SV(x)1(含 SV40 大 T 抗原温度敏感性突变体)转染 CRE 包装细胞系产生的病毒上清液感染目的细胞，获得了表达Ⅰ型胶原和 DPP 的小鼠成牙本质细胞样细胞系 MO6 - G3，已传 30 余代。王捍国、肖明振、赵守亮等(2003)采用分子生物学和细胞生物学等方法，原代培养人成牙本质细胞样细胞后，转染人端粒酶逆转录酶(hTERT)基因，建立起永生化人成牙本质细胞样细胞系 hTERT - hOd - 1，该细胞系基本上为正常细胞而无明显转化特征，保持了人成牙本质细胞样细胞的生物学特征，在体外培养中可分泌牙本质细胞外基质并钙化。郝建军、Narayanan K、Ramachandran A 等(2002)用基因转染的方法将端粒酶基因和 SV40 大 T 抗原整合到大鼠牙乳头细胞内，使这些细胞获得永生化，表达牙本质特异性蛋白 DMP1、DMP2(或 DPP)和 DMP3(或 DSPP)。体外矿化液培养以及大鼠体内移植可形成牙本质样结构。

三、牙髓干细胞的体外培养

干细胞(stem cell)是一种具有多向分化潜能和自我复制功能的未分化细胞，在特定的条件下，可以分化为不同的功能细胞，形成多种组织和器官。胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)的分化和增殖构成个体发育的基础；而成体干细胞(adult stem cell, ASC)的进一步分化则是成体组织、器官形成和修复再生的基础。牙髓干细胞是存在于牙髓组织中的一种成体干细胞，在体外培养条件下可定向分化为牙髓细胞和成牙本质细胞等，这对于认识牙髓牙本质复合体的发育以及损伤修复机制、探索新的牙髓保存治疗技术具有重要意义。2000 年，Granthos S, Nankani M, Brahim J 等(2000)采用 19～29 岁的人第三磨牙牙髓组织进行原代培养，从中分离出了克隆源性和增殖快的成年干细胞。它们在含有维生素 C 和 β-磷酸甘油的培养液中经过 5～6 周培养可以形成钙化结节。细胞复合到羟基磷灰石 - 磷酸三钙(HA - TCP)支架上，移植到裸鼠皮下可形成牙本质 - 牙髓复合体。Miura M, Gronthos S, Zhao M 等(2003)从人脱落的乳切牙牙髓组织中分离培养出高增殖活性、克隆源性的成年干细胞(stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED)。SHED 可多向分化为多种细胞，包括神经细胞、脂肪细胞、成牙本质细胞等。SHED 体内移植可以诱导骨形成，生成牙本质，在大脑中存活并呈现神经细胞特征。

陆群(2002)成功地分离了小鼠牙髓干细胞，其具有增殖快和多向分化的特性，还发现牙髓干细胞的分化是在多种因素的调控下有序地进行，转录因子在干细胞的分化调控中发挥着关键的作用。细胞外因素可调控牙髓干细胞的分化方向，如可扩散的细胞因子 BMP、TGF - β、FGF 在体外可诱导分化生成成牙本质样细胞。同时，干细胞分化也受到相邻细胞间的相互作用，如 Notch - RBP - J 信号途径的调节。

四、外胚间充质干细胞的体外培养

在颅神经嵴发育过程中，颅神经嵴向腹外侧迁移到达面突的中胚层以后，被称为外胚间充质。其中存在外胚间充质干细胞(ecto - mesenchymal stem cell, EMSC)。EMSC 是胚胎颌面发育过程中的暂时性结构，具有向多种细胞分化的潜能，可以分化为成骨细胞、成软骨细胞、牙乳头细胞、牙囊细胞、雪旺细胞、听神经节等，并将形成上颌骨、下颌骨、颞下颌关节软骨、牙本质、牙骨质、牙周膜等组织器官，是多能干细胞。作为颌面部多种组织的前体细胞，EMSC 在颌面部发育和分化研究中占有重要的地位，并可为组织工程提供可靠的细胞来

源,为临床应用奠定坚实的基础。目前,对外胚间充质干细胞的研究主要集中于体内发育过程中的基因表达等,EMSC 的体外培养及其定向诱导分化的研究报道很少。Langille RM, Solarsh M(1990)报道,胚胎 12.5 d 大鼠下颌突 EMSC 用矿化液诱导,3 d 即可形成集落,6~7 d即有矿化结节形成,Von Kossa 染色阳性,出现成骨细胞特征性改变,如分泌Ⅰ型胶原、骨钙素,碱性磷酸酶活性增高等,表明下颌突 EMSC 被成功诱导为成骨细胞。

邓蔓菁、金岩、史俊南等(2002)分离培养了人早期胚胎面突 EMSC,观察了该细胞的生长特性、在体内外自发分化的趋势、在体外定向诱导分化的过程,探讨了多种生长因子对干细胞分化的影响,如 TGF-β 促进 EMSC 向平滑肌细胞分化,矿化液诱导 EMSC 分化为成骨细胞,TGF-β1+牙本质非胶原蛋白诱导 EMSC 分化为成牙本质样细胞。同时初步获得了永生化的外胚间充质干细胞系 hTERT-EMSC-2。该研究证实早期胚胎面突 EMSC 为多能干细胞,具有多向分化潜能,在外源因子作用下可分化为多种终末分化的功能细胞。张光东、金岩、史俊南等(2003)则采用差异消化贴壁法分离和纯化培养了 SD 大鼠颌突 EMSC,联合使用 bFGF 和 IGF-Ⅰ可在体外诱导大鼠颌突外胚间充质干细胞向成牙本质细胞样细胞分化。将诱导的细胞与珊瑚和牙本质陶瓷粉复合后,分别植入大鼠和裸鼠皮下,在材料的周围出现了少量的钙化基质沉积,具有成牙本质细胞在体内形成矿化基质的功能。说明 bFGF 和 IGF-Ⅰ可以实现颌突外胚间充质干细胞向成牙本质细胞的分化。该细胞可以应用于牙齿发育和牙体牙髓损伤修复的研究,而且可为组织工程牙齿研究提供种子细胞。

第三节 体外培养技术在牙髓细胞分化研究中的应用

在牙髓生物学中,成牙本质细胞诱导分化研究是非常重要的课题。目前多数学者认为:成牙本质细胞是从牙胚的外胚层间充质(ectomesenchyme)、牙乳头细胞或成熟牙髓的未分化间充质细胞分化而来。体内实验已证实:当成熟的恒牙牙髓受到损伤后,间充质细胞可以分化为成牙本质细胞并分泌牙本质。为了能够在体外研究牙髓细胞的这一分化过程,便于分析影响分化的因素,人们已经将牙髓细胞在体外诱导分化为成牙本质或成牙本质样细胞。在这一体外研究中,体外培养技术是重要的实验手段,本文就体外培养技术在牙髓细胞分化中的应用作简要综述。

一、常规培养

(一)培养对象:目前已成功地培养了人、鼠、兔、牛和猪等种属的牙髓细胞,其中大鼠牙髓细胞已有两个克隆化细胞系(RPC-C2A 和 RDP4-1)。动物愈年轻,其牙髓细胞的活力愈高,易于培养。

(二)培养液:常用的有 DMEM、RPMI 1640,也有报道使用 MEM、EBM、DMEM/F-12、HAMF-10 和 M199 等。根据研究的需要,培养液中加入其物质而成为化学条件培养液。如为了观察牙髓细胞的分化和钙化,常加入维生素 C(50 μg/mL)、β-磷酸甘油(5~10 mmol/L)、地塞米松(10 nmol/L)等。维生素 C 和 β-磷酸甘油均为细胞合成基质的原料,地塞米松可促进原代和传代牙髓细胞的钙化,1,25-二羟基维生素 D3 因有较强的诱导分化作用也常被使用。

(三)培养方法:动物可采取断头法处死,直接获取牙髓;人可以采用针麻或局麻拔牙。

无菌条件下劈开牙齿，取出牙髓。抽取的牙髓用抗生素反复冲洗，防止污染。原代牙髓细胞培养可采用组织块贴附法和消化法。

(四)培养结果

1．影响分化的因素

在牙胚和成熟牙齿中，牙髓细胞和牙乳头细胞的分化是连续和复杂的过程。目前通过体外研究，发现生长因子和激素是影响牙髓细胞分化的重要因素之一。Nakashima M(1991, 1992)采用消化法成功地培养了牛牙髓细胞，并观察到3种形态的细胞：星形的成纤维细胞、矛状细胞和内皮样细胞。当传代细胞接近融合时，星形细胞的比例已达97%，此时碱性磷酸酶的活性分别较牙龈和口腔黏膜细胞高24倍和28倍。传代细胞培养50 d后出现轻微钙化结节。透射电镜下结节中可见前成牙本质样细胞(preodontoblast - like cell)，同时在其周围有胶原基质沉积等钙化起始现象。在随后的研究中发现：血小板源性生长因子(PDGF)和胰岛素样生长因子 - Ⅰ(IGF - Ⅰ)主要刺激原代牙髓细胞的增殖，酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)、IGF - Ⅰ和 IGF - Ⅱ增强细胞外基质蛋白多糖的合成，而转化生长因子 - β(TGF - β)、PDGF、aFGF和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)可以调节牙髓细胞向成牙本质细胞分化，这是因为这4种生长因子使处于增殖期和静止期的牙髓细胞碱性磷酸酶活性下降40% ~ 65%。最近有学者认为牙髓细胞在分化为成牙本质细胞之前，需要经过一个去分化(dedifferentiation)的过程，即碱性磷酸酶活性下降，细胞成为分化潜能大的间充质细胞，进而碱性磷酸酶活性升高，分化为成牙本质细胞。

Kasugai S, Shibata S, Suzuki S 等(1993)用消化法培养了7周龄 Wistar 大鼠的牙髓细胞，细胞传至52代后克隆化两次，建立的RPC - C2A 细胞系碱性磷酸酶活性很高，比体外有钙化能力的 MC3T3 - E1 细胞系(源于新生小鼠颅盖骨)的酶活性还要高，电泳显示 RPC - C2A 细胞系的碱性磷酸酶分子量与牙髓组织的相同。作者进一步观察了大鼠原代和传代牙髓细胞的分化和钙化能力，在培养液中(含 50μg/mL 维生素 C)加入 10nmol/L 地塞米松和 10mmol/L β - 磷酸甘油，细胞钙化的面积和钙的含量均较对照组高，并且钙化区域与碱性磷酸酶阳性区域相吻合。此外还发现地塞米松增强大鼠骨基质基因的表达。McCulloch CAG, Tenenbaum HC(1998)的实验表明：地塞米松能够刺激骨前体细胞(osteoprognitor cell)的增殖。尽管地塞米松促进培养的牙髓细胞钙化的机制尚不完全清楚，但人们认为糖皮质激素可刺激成牙本质细胞前体细胞的增殖和分化。

2.牙髓细胞分化的标志

在体内牙髓细胞分化为成牙本质细胞后，细胞呈高柱状，胞核偏极，并且分泌牙本质基质，这一变化通过组织学观察即可确认。而体外的牙髓细胞分化和形成牙本质需要较长的时间，而且分化前期甚至成熟细胞的形态和超微结构与牙髓细胞无明显差异，成牙本质细胞的特异表型标志是评估牙髓细胞分化不可缺少的工具。

Bronckers ALJJ, Lgarau DM, Woltgens JHM(1989)采用免疫组织化学方法观察了 DPP 在牙髓组织中的定位，发现 DPP 只存在于成牙本质细胞中，并认为 DPP 可以作为成牙本质细胞特异的表型标志。同时作者用放射自显影法观察到牙髓细胞合成和分泌 DPP，提示培养的大鼠牙髓细胞已经分化，并已具有成牙本质细胞的某些表型。MacDougall M, Simmons D, Luan X 等(1997)用免疫组化方法发现 DPP 在体外小鼠牙乳头细胞钙化结节有表达，提示牙乳头细胞可以分化为成牙本质样细胞。Tsukamoto Y Kakutani S, Shinike T 等(1992)采用贴

附法培养了人乳牙和多生牙的牙髓细胞，在 183 个牙中有 6 个牙的牙髓细胞在传代培养 10～15d后出现钙化结节，原位包埋电镜标本可观察到基质小泡和针状结晶，并在其周围均有胶原纤维。X 线衍射分析表明钙化结节与羧基磷灰石的能谱峰值相似。进一步加入 1,25－二羟基维生素 D3 可使细胞的碱性磷酸酶升高 7 倍。用放射自显影观察基质的合成情况，提示形成钙化结节的细胞不仅能合成Ⅰ型胶原，而且合成纤维黏连蛋白(Fn)和骨黏合素。由于钙化结节与羧基磷灰石能谱相似，而且合成牙本质特异性的非胶原基质蛋白 DPP，提示钙化结节周围牙髓细胞已具有合成牙本质或类牙本质的功能。因此，这些细胞已分化为成牙本质细胞或成牙本质样细胞。此外，钙化结节的出现也为人们研究牙髓细胞分化、生理或病理状况下的钙化提供了良好的体外实验模型。

成牙本质细胞表达特异性基质非胶原蛋白(non－collagenous proteins，NCPs)。牙本质是一种特殊的钙化组织，其生成细胞——成牙本质细胞不仅表达钙化组织特异性蛋白，还表达牙本质特异性蛋白。牙本质特异性蛋白是指由成牙本质细胞合成和分泌的，只在牙本质中存在的蛋白。DSP 和 DPP 是已知的牙本质特异性蛋白(或蛋白家族)，负责 NCPs 的沉积和成熟，而它们是同一基因 DSPP 转录和翻译后的前体蛋白的剪切产物。目前认为 DSPP、DPP 和 DSP 是成牙本质细胞的特异性标志物。

二、立体培养

胶原基质在酸性溶液中可充分溶解，将其与细胞混匀后，加入培养液调整 pH 值至适宜，胶原纤维析出成凝胶状态，细胞在三维立体结构中生长称为立体培养。由于细胞在立体网架中生长更接近体内环境，而且标本包埋后可连续切片，使研究工作更为科学和方便。

(一)立体培养的对象、条件、培养液和培养原代牙髓细胞的方法：常规方法。

(二)培养结果：

Bellows CG，Melcher AH，Aubin JE 等(1981)将商品化的胶原(Vitrogen 100)作为三维立体支架，成功地培养了猴牙周膜成纤维细胞和人牙龈成纤维细胞，并对细胞的收缩能力进行了研究。

Bouvier M，Joffre A，Maglire H 等(1990)将胶原和硫酸软骨素混合制成凝胶，传代牙髓细胞以此为支架连续培养 50 d。培养 12 d 时混合凝胶组部分纤维为 Von Kossa 染色阳性；20 d 时凝胶几乎全部呈阳性，高倍镜下可见阳性区为黑色颗粒沉积。随着培养时间的延长，出现针状结晶并不断增大，胞外胶原基质增多；50 d 时细胞核极化，细胞外胶原沉积，出现弥散的小针状结晶。X 线能谱分析表明针状结晶中 Ca 和 P 含量较高，而且随着培养时间的延长，钙化结晶增多。对照组(凝胶中仅有胶原)细胞仅有胶原合成而无钙化现象。此外在三维立体结构中的牙髓细胞形态和生长状况与体内细胞相似，以上结果提示硫酸软骨素可以影响牙髓细胞的分化，进而导致细胞在体外的钙化。

三、牙髓组织培养

牙髓组织培养是将牙髓组织切成碎块($1mm^3$)，贴附于玻片或基质明胶表面，再置于金属支架上进行培养，观察牙髓细胞在原位的分化能力。

（一）培养方法

通常牙髓组织采用 Trowell 型器官培养装置，即在不锈钢金属网架上放置支持物，新鲜的牙髓组织切成 $1mm^3$ 的碎块，均匀地铺于支持物上，加入的培养液液面与支持物平齐或略微超出，以不浸没牙髓组织为宜，这样使得牙髓组织可以获得较高的氧分压又不至于干燥。目前常用的支持物有脱钙的骨和牙本质以及 Millipore 滤膜等。

（二）培养结果

Seux D，Couble ML，Hartmann DJ 等(1991)将人牙髓组织块(约 $1mm^3$)与微小晶体颗粒共同培养，4 周后即可见游出的细胞包绕颗粒，并且这些细胞出现成牙本质细胞的一些特征，如胞核偏极，丰富的高氏体和线粒体，合成Ⅰ型胶原而无Ⅲ型胶原，有 actin 和 vimentin 的沉积等。

高玉好、诹访文彦、太田义邦等(1994)将 200 μg 牛骨形成蛋白(BMP)置于脱矿的牙本质基质明胶和牙髓组织之间，放在 Trowell 型培养装置上培养了 21 d。结果显示：牙髓组织与 BMP 共同培养 3 d，牙髓组织与 BMP 接触的部分可见星形细胞；培养 7 d，可见软骨母细胞样细胞和基质形成；培养 21 d，牙髓细胞内外可见分泌基质小泡。以上结果表明，当 BMP 与人牙髓组织共同培养时，人牙髓细胞可以分化成类似软骨母细胞的功能细胞。此外体外培养的牙髓成纤维细胞在培养中可出现钙化结节，碱性磷酸酶活性较高，对甲状旁腺激素、维生素 D_3、前列腺素 E_2、胰岛素、转化生长因子 β、上皮细胞生长因子的反应类似于成骨细胞。因此推测体外培养的牙髓细胞仍具有体内牙髓细胞的某些生物学特征，并且在体外有分化为成牙本质细胞或软骨母细胞等功能性细胞的能力。

第四节　体外牙胚培养在成牙本质细胞分化研究中的应用

在牙胚的发育过程中，中胚层与外胚层相互作用，首先形成牙板，经过蕾状期、帽状期、钟状期和硬组织形成期，最后萌出，承担咀嚼功能。在这一系列的发育过程中，中胚层和外胚层的相互作用，使中胚层的牙乳头细胞分化为成牙本质细胞。因此，体外培养牙胚为研究体外成牙本质细胞分化提供了理想的实验模型。学者们不仅成功地在体外培养了多种动物的牙胚，而且分别培养了牙乳头细胞和牙囊细胞。本文就体外牙胚培养在成牙本质细胞分化研究中的应用作简要综述。

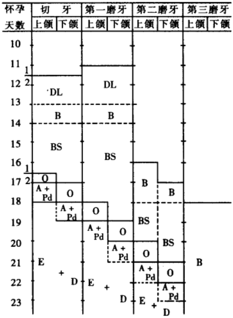
一、牙胚发育阶段的确定

为了能够观察牙乳头细胞分化的关键过程，确定各种动物牙胚发育时序是牙胚培养的首要工作。目前已比较明确小鼠、大鼠、豚鼠、兔和人等的牙胚发育时序。

（一）小鼠牙胚发育时序（表 12.1）

在研究不同动物的成牙本质细胞分化时，要根据各牙齿发育时序选择合适胎龄的动物。体外培养小鼠第一磨牙牙胚时常选 17 d 或 18 d 的胎鼠，第二磨牙选 19 d 或 20 d 胎鼠，第三磨牙选出生后 11 d 小鼠。大鼠、豚鼠的发育时序与小鼠基本一致。

表 12.1　小鼠牙胚发育时序表



DL:牙板;B:蕾状期;BS:钟状期;O:成牙本质细胞;
A: 成釉细胞;Pd:前期牙本质;E:牙釉质;D:牙本质

(二)人牙胚发育时序(表 12.2)

表 12.2　人牙胚发育时序表

胎龄	发育特征
44 ~ 48 d	牙板形成
55 ~ 56 d	乳牙切牙、尖牙、磨牙进入蕾状期
14 周	乳牙牙胚进入钟状期 成牙本质细胞的终末分化开始 恒牙进入蕾状期
18 周	乳牙成牙本质细胞分泌牙本质基质 成釉器出现功能性成釉细胞
32 周	恒牙成牙本质细胞分泌牙本质基质 成釉器出现功能性成釉细胞

二、体外培养

(一)支架器官培养

用于牙胚培养的支架分为两类:Trowell 支架和半固体培养基支架。Trowell 支架是一种不锈钢金属滤网,是 1959 年由 Trowell 发明的。牙胚培养时将微孔滤膜置于 Trowell 支架上,牙胚放置在滤膜上进行培养。培养液液面与滤膜平齐,或略超出,但以不浸没牙胚为宜,这样使牙胚获得较高的氧分压。这一方法要求所用的滤膜必须有良好的渗透性以保证培养器官的营养。滤膜的厚度约 10 μm,孔径可根据需要在 0.05 ~ 1 μm 左右。培养器皿有

成品化的，也可自制支架放置于适当的培养皿中。该方法操作简便，可用于多种器官的培养。但是，由于器官与滤膜接触面受到一定压力，存在变形的可能。另外可以采用琼脂半固体培养基，该培养基可以较好地保持牙胚的形态。它是利用琼脂冷却后可以凝固的原理，将培养基与琼脂（或琼脂糖）按一定比例混合（琼脂终浓度为0.4%～0.5%），冷却后，将牙胚放置于培养基表面进行培养。半固体培养基既能支撑表面培养的器官，起到支架作用，又可保证培养基内的营养成分渗入器官。培养可在24孔板进行；若所用的材料昂贵，也可在96孔板进行或两种类型的支架同时使用。张蓉等采用改良的BGJb无血清培养基进行小鼠牙胚的体外培养，并在培养基中加入100 μg/mL抗坏血酸（VitC）和10^{-7}mol/L的维甲酸以促进胶原在体外的沉积和维持体外牙胚的正常生长。结果显示：牙胚生长良好，最长的可在体外存活20 d。

（二）培养液

培养液主要由培养基、血清和维生素等组成。培养基的最佳组分应根据培养组织/器官和实验目标进行选择。培养基包括MEM、BGJb、DMEM、RPMI 1640、鸡胚浸液，血清为10%～20%胎牛血清（FCS），维生素为50～150 μg/mL Vit C。对于发育早期器官的培养，MEM是一种良好的培养基。但是随着进一步的发育，不同器官可能有不同的特殊要求，需要在化学成分限定的培养基（chemically defined medium）中加入不同的组分。对于完整牙胚的培养，通常采用DMEM和F12混合培养（1:1），并加入50 μg/mL的转铁蛋白。若观察牙胚后期的发育状况，常采用BGJb培养基，并需在培养基中加入50～150 μg/mL的VitC，以促进胶原的形成和沉积。Thelseff I, Partanen Am, Kuusela P等（1998）发现小鼠牙胚在培养液Ⅰ（MEM，10%FCS，Vit C）中细胞的分化较培养液Ⅱ（BGJb，20%FCS，10%鸡胚浸液，Vit C）快。如成釉细胞前体在培养液Ⅰ中培养，1周后出现极化，而在培养液Ⅱ中需2周。多数学者主张培养环境用高氧压的混合气体（50%O_2，5%CO_2，45%N_2），此环境下有利于牙胚的发育和分化。

（三）牙胚分离培养

将动物浸入75%乙醇10 s消毒表面，断头处死，分开上、下颌骨，挑破牙胚上方的黏膜，分离牙胚。大鼠的牙胚约有1/3小米粒大小。体视显微镜下完整的牙胚呈梨形，外表可见丰富的血管。若需分离外胚层，则用0.5%～1%胰酶消化20～30 min后，机械分离。培养过程中每2～3 d换液1次。

三、培养结果

汪平（1998）、郝建军（1997）采用Trowell型支架培养17 d SD胎鼠的第一磨牙牙胚，培养9 d，牙胚在体外可以维持生长，从培养开始时的帽状期发育到钟状晚期，观察到牙乳头细胞分化为成牙本质细胞，并有前期牙本质的形成。开始培养时牙胚处于帽状期向钟状期的过渡阶段；培养3 d时内釉细胞已分化为前成釉细胞，部分牙乳头细胞极化；6 d时牙胚中出现高柱状成牙本质细胞，并分泌少许前期牙本质基质；9 d时前期牙本质基质形成更多，成牙本质细胞突起伸入前期牙本质中，牙乳头组织中央细胞开始退变。Thelseff I, Sahlberg C, 等（1999）认为成牙本质细胞的分化主要与细胞外基质、生长因子和基底膜等因素有关。由于基底膜主要起支架作用，细胞外基质和生长因子附着于基底膜，本文主要讨论细胞基质和生长因子及其受体与成牙本质细胞分化的关系。

(一)细胞外基质

细胞外基质主要包括糖蛋白、蛋白多糖和胶原等,细胞外基质与细胞之间的密不可分的关系,决定了细胞外基质在牙胚的组织细胞分化中的重要作用。

1.糖蛋白的合成和表达

Thesleff I, Paartamen AM, Vainios S 等(1991)在体外培养的 17 d 小鼠下颌第一磨牙牙胚中可见大量的 Fn 沉积在外中胚层交界处,牙乳头细胞 Fn 为阳性,而成釉器为阴性。随后作者又将牙乳头细胞分离培养,发现单一的牙乳头细胞可合成 Fn,但并不沉积 Fn,认为可能是分泌的 Fn 与细胞和基质结合的区域分子构象改变,或是分泌的蛋白酶将其降解所致。

2.蛋白多糖的合成和表达

Tziafas D, Amar S, Staubci A 等(1988)观察了氨基多糖对体外培养的 18 d、19 d 胎鼠第一磨牙牙胚的影响,发现经过 2~4 d 的培养,完全培养液中加入透明质酸酶和硫酸软骨素(0.1~0.2 mg/mL),可以观察到体积增大和极化的成牙本质细胞有合成能力。^{3}H－胸苷放射自显影证实在开始培养时,这些细胞已进入了分裂后期,没有发现功能性的成牙本质细胞和成釉细胞,该结果揭示细胞外基质透明质酸酶和硫酸软骨素的混合物在低浓度时可维持成牙本质细胞处于极化状态。

Sato E, Kameyama Y, Maeda 等(1993)用 15 d 的胎小鼠牙胚做体外培养实验,培养 6d 后,肝素组中胚层细胞没有进入分化阶段,而含硫酸软骨素、硫酸角质酸、透明质酸及用肝素亲和层析处理过的血清各组均可使中胚层细胞分化为成牙本质细胞,并同时分泌前期牙本质。培养 12 d 时,肝素组的部分细胞才出现分化,并分泌前期牙本质。免疫组化实验证明外源性肝素并不能阻止Ⅳ型胶原、层黏连蛋白和 Fn 在基底膜和细胞外的沉积。以上结果提示外源性肝素延迟成牙本质细胞的分化。

(二) 生长因子及其受体

目前发现许多生长因子家族在牙胚的发育和细胞分化中起着重要作用。这些生长因子有转化生长因子家族,成纤维细胞生长因子(FGF)家族,血小板源性生长因子(PDGF)族,胰岛素样生长因子(IGF)家族等。

Begue－Kirn C, Smith AJ, Rnch JV(1994)分离 17 d 胎鼠牙乳头组织,并将其分别埋入含有牙本质基质蛋白、TGF－β1、BMP2 的半固体培养基中培养 6 d,结果显示 TGF－β1、BMP2 可以刺激牙乳头细胞分泌Ⅰ型胶原和 Fn,而对细胞的极化无促进作用;TGF－β1 及 BMP2 和无活性的牙本质基质提取物组合时,培养的牙乳头周边细胞伸长,极化并有胞外基质的沉积;当提取物的活性成分与抗 TGF－β 抗体共同孵育时,该活性成分对牙乳头细胞失去诱导能力。这一结果证实,牙本质中 TGF－β 样分子的存在对启动成牙本质细胞结构和功能的分化方面具有调控作用。朱奇等取 17d 胎龄小鼠下颌第一磨牙牙胚,胰蛋白酶消化分离牙乳头,置半固态培养基培养 6d,半固态培养基中加入重组 TGF－β1 和肝素;组织学观察发现:TGF－β1 加肝素可诱导牙乳头周边细胞发生极化,并分泌胞外基质。单独加入 TGF－β1 未见细胞极化,但基质分泌增加。结果证实 TGF－β1 能诱导前成牙本质细胞的细胞学和功能上的分化。

Chai Y, Robbins K, Slavkin HC 等(2000)观察了 PDGF－A 及 PDGF 受体在 10d 胎鼠(42～44 体节)下颌骨发育的效应及表达。牙齿形成的早期阶段,PDGF－A 定位于牙板,PDGF 受体则位于其周围致密的中胚层。进入蕾状期后,PDGF－A 不仅在成釉器而且在周围致密

的中胚层有表达，PDGF 受体仅出现在中胚层，培养 9 d 后，PDGF－A 的阳性已极弱，而 PDGF 受体的阳性强度保持不变。此外，外源性的 PDGF－A(20 ng/mL)可使牙胚的体积增大，并且较对照组(蕾状期)提前进入帽状期。以上结果提示：内源性 PDGF－A 和 PDGF 受体能够调节牙齿发育的大小和速度。外源性的 aFGF 的实验结果与 PDGF－A 相似，aFGF (20 ng/mL)也可调节牙齿发育；外源性 bFGF 可以促进大鼠牙胚的发育和细胞分化，加快牙齿发育速度。而表皮生长因子(20 ng/mL)和 TGF－α 均明显使牙胚发育的体积减小。Young W，Ruch J，Stevens M 等(1994)对 16 d 胎鼠牙胚在半固体无血清 RPMI(加有维生素 C 和视黄酸)培养基上培养，发现胎牛血清可启动牙胚细胞的分化，而 IGF－Ⅰ则可使分化加强。

陈新梅(1998)观察甲状旁腺激素对大鼠牙胚分化发育的影响，发现甲状旁腺激素可以促进成牙本质细胞的分化和牙本质基质的形成。王景杰(2000)则发现氯丙嗪可以降低牙胚中的 Ca^{2+} 含量和碱性磷酸酶活性，抑制基质分泌和成牙本质细胞分化。张蓉等用特异性反义寡核苷酸阻断牙本质涎磷蛋白翻译后，牙胚体积明显缩小，牙本质基质厚度变薄，基质中胶原纤维粗细不等，排列紊乱。

四、小鼠下颌弓体外培养模型的建立

值得注意的是：下颌弓体外培养模型广泛应用于发育学研究，是研究上皮和间充质相互作用的良好工具，在下颌软骨、牙胚、舌等发育研究中发挥了重要作用。下颌弓的体外培养技术早在 20 世纪 80 年代初就已提出，但在当时未得到重视。到 80 年代末，随着发育生物学的兴起，Slavkin HC，Bringas PJ 等(1989)将其改进后，逐渐推广开来，成为发育学研究中一个有力的工具。刘世森等分离 11 d 胎鼠的下颌弓，在含 5% CO_2 的 37℃孵箱中用无血清 BGJb 培养液培养，小鼠下颌弓在体外生长良好。连续培养 11 d 后，牙胚发育进入帽状期，成釉器、牙乳头和牙囊形成；下颌软骨位于下颌突中央，在下颌软骨背外侧，大量成骨细胞聚集并有部分骨基质形成；下颌弓中央背侧舌形成，舌背表面有乳头样突起；下颌弓上皮变为复层鳞状上皮，部分下颌弓表面有角化物堆积。小鼠下颌弓体外培养模型的成功建立，为研究下颌软骨/下颌骨、舌、牙齿等结构的发育提供了良好的研究模型。在此基础上，研究了 BMP－4 在小鼠牙胚形态发生初期的表达和作用，结果表明 BMP－4 在诱导间充质细胞增殖、引导牙源性上皮延伸及诱导下颌软骨发生等方面具有重要作用。

(王捍国，郝建军)

参考文献

1. Trowell OA. The culture of mature organs in a synthetic medium. Exp Cell Res. 1959;16:118
2. Thesleff I. Differentiation of odontogenic tissues in organ culture. Scand J Dent Res. 1976;84:353
3. Ruch JV, Karcher－Djuricic V. On odontogenic tissue interactions. In: Extracellular matrix influences on gene expression, eds. H.C.Slavkin and R.C.Greulich. Academic Press, New York.1978;549
4. Liu XL. Isolation and growth of adult human epidermal keratinocytes in cell culture. J Invest Dermatol. 1978;71:157
5. Rubin K, Hook M, Obrink B, et al. Substrate adhesion of rat hepatocytes: Mechanism of attachment to collagen substrates. Cell.1981;24:463
6. Bellows CG, Melcher AH, Aubin JE. Contraction and organization of collagen gels by cells cultured from peri-

odontal ligament, gingiva and bone suggest functional differences between cell types. J Cell Sci. 1981;50:299
7. G.D.华斯来. 动物组织培养技术. 辽宁:科学出版社.1982;2:26
8. Le Douarin, N.M. The Neural Crest. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K. 1982
9. Bronckers ALJJ, Bervoets THJM, Woltgens JHM. A morphometric and biochemical study of the pre - eruptive development of hamster molars in vivo. Archs Oral Biol. 1982;27:831
10. Slavkin HC, Bringas PJ, Cummings E, et al. Initiation of quail and mouse mandibular chondrogenesis and osteogenesis in a serumless, chemically - defined medium. Calcif Tissue Int. 1982; 34(1):111
11. Linde A. Dentin and dentinogensis. USA: CRC Press Inc. 1984;47
12. Navia JM, Snider C, Punyasingh et al. Organ culture study of effect of Vitamin - A - Deficiency on rat third molar development. Archs Oral Biol. 1984;29(11):911
13. Lesot H, Karcher - Djuricic V, Meyer JM, et al. Dental cell interaction with extracellular matrix constituents: type I collagen and fibronectin. Differentiation.1985;29:171
14. Lesot H, Smith AJ, Meyer JM, et al. Cell - matrix interactions: influence of non - collagenous proteins from dentin on cultured dental cells. J Embryol Exp Morphol.1986;96:195
15. Cam Y, Meyer IM, Staubli A, et al. Epithelial - mesenchymal interactions: effects of a dental biomatrix on odontoblasts. Arch Anat Microbiol Morphol Exp. 1986; 75:75
16. McCulloch CAG Tenenbaum HC. Dexamethasone induces proliferation and terminal differentiation of osteogenic cells in tissue culture. Anat Rec. 1986;215:397
17. Laine M, Thesleff I. Development of mouse embryonic molars in vitro: An attempt to design defined culture conditions allowing mineralization. J.Biol.Buccale.1986; 14:15
18. 史俊南、韩桃娟主编,口腔内科学.西安:第四军医大学.1987:37
19. 郑斯涌. 组织细胞低温保存的几个技术措施. 医用冷冻技术,1987;1:10
20. Thesleff I, Partanen AM, Kuusela P, et al. Dental papilla cells synthesize but do not deposit fibronectin in culture. J Dent Res. 1987;66(6):1107
21. Thesleff I, Partanen AM, Kuusela P et al. Dental papilla cells synthesize but do not deposit fibronectin in culture. J Dent Res. 1987;66(6):1107
22. Tanaka Y. Isolation and cultivation of fibroblast - like cells derived from human dental pulp. Shika Igaku(J Osaka Odontal SOC).1988;51(40):682
23. Kasugai S, Adachi M, Ogura H. Establishment and characterization of a clonal cell line(RPC - C2A) from dental pulp of the rat incisor. Archs Oral Biol. 1988;33(12):877
24. Tziafas D, Amar S, Staubli A, et al. Effects of glycosaminoglycans on in vitro mouse dental cells. Arch Oral Biol. 1988;33: 735
25. Kohji T. An experimental study on dentinogenesis in rat incisor pulp tissue. Shikwa Gakuho. 1988;88:943
26. Tziafas D, Amar S, Staubli A et al. Effects of glycosaminoglycans on in vitro mouse dental cells. Archs Oral Biol. 1988;33(10):735
27. Bronckers ALJJ, Lyaruu DM, Woltgens JHM. Immunohistochemistry and extracellular matrix protein during various stages of dendinogenesis. Conn Tissue Res. 1989;22:65
28. Slavkin HC, Bringas PJr, Sasano Y, et al. Early embryonic mouse mandibular morphogenesis and cytodifferentiation in serumless, chemically defined medium: a model for studies of autocrine and/or paracrine regulatory factors. J Craniofac Genet Dev Biol. 1989; 9(2):185
29. Inoki R, Kudo T, Olgart FM, et al. Dynamic aspects of dental pulpmolecular biololgy, Pharmacology and Pathophysiology. London Hapman and Hall Press. 1990: 29
30. Tsukamotoy OT. Alkaline phosphatase activity of human dental pulpal fibroblasts. Shika igaku(J Osaka Odon-

tal SOC).1990;53(6):475

31. Bouvier M, Joffre A, Magloire H. In vitro mineralization of a three - dimensional collagen matrix by human dental pulp *in the presence of chondroitin sulphate* . Arch *Oral* Biol. 1990;35: 301

32. Langille RM and Solursh M. Formation of chondrous and osseous tissues in micromass cultures of rat frontonasal and mandibular ectomesenchyme. Differentiation. 1990; 44(3):197

33. Inoki R, Kudo T, Olgart LM. Dynamic aspects of dental pulp: molecular biology, pharmacology and pathophysiology. London: Hapman and Hall press. 1990:29

34. Bouvier M, Joffre A, Magloire H. In vitro mineralization of a three - dimensional collagen matrix by human dental pulp cells in the presence of chondroitin sulphate. Archs Oral Biol. 1990;35(4):301

35. Slavkin HC, Sasano Y, Kikunaga S, et al. Cartilage, bone and tooth induction during early embryonic mouse mandibular morphogenesis using serumless, chemically - defined medium. Connect Tissue Res. 1990; 24 (1):41

36. Nakashima M. Establishment of primary cultures of pulp cells from bovine permanent incisors. Archs Oral Biol.1991;36(9):655

37. 陈筠. 牙髓碱性磷酸酶的提纯、cDNA 克隆和氢氧化钙对其活性、表达的影响. 第四军医大学博士学位论文.1991

38. Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, et al. Odontoblast - like cytodifferentiation of human pulp cells in vitro in the presence of calcium hydroxide - containing cement. Arch Oral Biol. 1991; 36: 117

39. Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, et al. Odontoblast - like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide - containing cement. Archs Oral Biol. 1991;36(2):117

40. Nakashima M. Establishment of primary cultures of Pulp cells from bovine permanent incisors. Archs Oral Biol.1991;36(9):655

41. Thesleff I, Partanen AM, Vainio S. Epithelial - mesenchymal interactions in tooth morphogenesis: the roles of extracellular matrix, growth factors, and cell surface receptors. J Craniofac Genet Devl Biol. 1991;11:229

42. 张郁. 口腔厌氧菌内毒素对人牙髓、牙周膜成纤维细胞和骨细胞的生物学效应及其相关临床研究. 第四军医大学博士学位论文.1992

43. Nakashima M. Mitogenic and dentin - inductive effects of crude morphogenetic protein from bone and dentin *in primary* adult pulp cell culture. *Oral Surg*. 1992a;73: 484

44. Nakashima M. The effects of growth factors on DNA synthesis, proteoglycan synthesis and phosphatase activity it bovine dental pulp cells. Arch Oral Biol.1992b; 37: 231

45. Tsukamoto Y, Fukutani S, Shinike T, et al. Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp - derived fibroblasts. Archs Oral Biol.1992;37(12):1045

46. Nakashima M. The effects of growth factors on DNA synthesis and alkalinphosphtase activity in bovine dental pulp cells. Archs Oral Biol.1992;37(3):231

47. Wise GE, Lin F, Fan_W. Effects of transforming growth factor - β1 on cultured dental follicle cells from rat mandibular molars. Archs Oral Biol. 1992;37(6):471

48. Begue - Kirn C, Smith AJ, Ruch JV, et a. Effects of dentin proteins, transforming growth factorβ1 and bone morphogenetic protein2 on the differentiation of odontoblast in vitro. Int J Dev Biol.1992,36:491

49. 吴军正、司徒镇强、陈建元等. 体外培养的人牙龈牙周牙髓成纤维细胞生长及形态特点. 实用口腔医学杂志.1993;9(4):655

50. 刘金刚、刘作斌. 低温医学. 北京:人民卫生出版社.1993:3

51. Lesot H, Begue - Kubler MD, Meyer JM, et al. Experimental induction of odontoblast differentiation and stimulation during reparative processes. Cell Mater. 1993; 3: 201

52. Anderson DJ. Celluar and moleucular biology of neural crest cell lineage diversification. Current Opinion in Neurobiology. 1993;3:8
53. Kasugai S, Shibata S, Suzuki S, et al. Characterization of a system of mineralized – tissue formation by rat dental pulp cells in culture. Archs Oral Biol. 1993;38(9):769
54. Sato E, Kameyama Y, Maeda, et al. Retardation of mouse odontoblast differentiation by heparin in vitro. Archs Oral Biol. 1993;38(2):145
55. Mayo ML, Bringas P, Chen LJR et al. Morphogenic effects of acidic fibroblast growth factor on mouse molars. J Dent Res. 1993;72:110
56. 郝建军. 离体培养人牙髓牙周牙龈成纤维细胞的生物学特征. 第四军医大学硕士学位论文.1994
57. 郝建军. 离体培养人牙髓牙周牙龈成纤维细胞的生物学特征.第四军医大学硕士学位论文.1994
58. Alliot – Licht B, Jean A, Gregoire M. Comparative effect of calcium hydroxide and hydroxyapatite on the cellular activity of human pulp fibroblasts in vitro. Archs Oral Biol.1994;39(6):481
59. 高玉好、诹访文彦、太田义邦等. 骨形成蛋白体外培养的人牙髓组织的诱导作用.第四军医大学学报.1994;15(5):328
60. Chai Y, Robbins K, Slavkin HC. Suggested of PDGF – A and cognate receptor in regulating tooth formation. J Dent Res. 1994;73:179
61. Mayo ML, Akiyama N, Shum L et al. Effects of TGF on tooth development. J Dent Res. 1994; 73: 179
62. Young W, Ruch J, Stevens M et al. Odontogensis in vitro: Cytodifferentiation with growth hormone & IGF – Ⅰ. J Dent Res. 1994;73:17
63. MacDougall M, Thiemann F, Ta H, et al. Temperature sensitive simian virus 40 large T antigen immortalization of murine odontoblast cell cultures: establishment of clonal odontoblast cell line. Connect Tissue Res. 1995;33(1 – 3):97
64. 汪平. 纤维黏连蛋白与牙髓细胞分化、牙髓组织修复关系的研究. 第四军医大学博士学位论文, 1995
65. Tabata MJ, Kim K, Yamashita K, et al. Hepatocyte growth factor is involved in the morphogenesis of tooth germ in murine molars. Development. 1996;122:1243
66. 赵大为. 人牙乳头细胞的体外培养和生物学特性的研究. 第四军医大学博士学位论文.1997
67. 郝建军、史俊南、牛忠英等. 离体培养人牙乳头细胞的消化法和贴壁法比较.牙体牙髓牙周病学杂志. 1997;7(1):20
68. Hao J, Shi J, Niu Z, et al. Mineralized nodules from human dental papilla cells in vitro. Eur J Oral Sci. 1997;105(4):318
69. Anderson DJ. Celluar and moleucular biology of neural crest cell lineage determination.Trend in Genet.1997. 6;13(7):276
70. MacDougall M, Simmons D, Luan X, et al. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. Dentin phosphoprotein DNA sequence determination. J Biol Chem. 1997;272(2):835
71. 郝建军. 激素和生长因子与牙乳头细胞、牙髓细胞、牙胚分化和矿化关系的体外实验研究. 第四军医大学博士学位论文.1997
72. 陈新梅. 甲状旁腺激素对牙乳头间充质细胞、组织影响的实验研究. 第四军医大学博士学位论文.1998
73. 陈新梅. 甲状旁腺激素对牙乳头间充质细胞、组织影响的实验研究. 第四军医大学博士学位论文.1998
74. Hanks CT, Fang D, Sun Z, et al. Dentin – specific proteins in MDPC – 23 cell line. Eur J Oral Sci.1998;

106 (Suppl 1):260

75. Begue－Kirn C, Krebsbach PH, Bartlett JD, et al. Dentin sialoprotein, dentinphosphoprotein, enamelysin and ameloblastin: tooth－specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation. Eur J Oral Sci. 1998;106(5):963

76. Bronckers AL, Price PA, Schrijvers A, et al. Studies of osteocalcin function in dentin formation in rodent teeth. Eur J Oral Sci. 1998;106(3):795

77. Torres－Quintana MA, Lecolle S, Goldberg M. Effects of inositol hexasulphate, a casein kinase inhibitor, on dentine phosphorylated proteins in organ culture of mouse tooth germs. Arch Oral Biol. 1998;43(8):597－610

78. Barlow.A.J, Bogardi.J.P, Ladher.R, et al. Expression of chick Barx－1 and its differential regulation by FGF－8 and BMP－4 signaling in the maxillary primordia. Dev Dyn. 1999;214:291

79. Bleicher F, Couble ML, Farges JC, et al. Sequential expression of matrix protein genes in developing rat teeth. Matrix Biol. 1999;18(2):133

80. Thesleff I, Sahlberg C. Organ culture in the analysis of tissue interaction. Molecular Embryology. 1999;97:23－31

81. Thonemann B, Schmalz G. Immortalization of bovine dental papilla cells with simian virus 40 large t antigen. Arch Oral Biol. 2000;45(10):857

82. Thonemann B, Schmalz G. Bovine dental papilla－derived cells immortalized with HPV 18 E6/E7. Eur J Oral Sci. 2000;108(5):432

83. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97 (25): 13625

84. Chai Y, Jiang X, Ito Y, et al. Fate of mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. Development. 2000;127:1671

85. Shigetani Y, Nobusada Y and Kuratani S. Ectodermally derived FGF8 defines the maxillomandibular region in the early chick embryo: epithelial－mesenchymal interactions in the specification of the craniofacial ectomesenchyme. Dev Biol. 2000,228(1):73

86. 王景杰. Calbindin－D28K 在人牙齿及牙胚发育过程中的分布及其在牙乳头细胞体外矿化过程中的合成与调节. 第四军医大学硕士学位论文.2000

87. 张蓉. 牙本质涎磷蛋白在牙齿发育、矿化及牙髓损伤修复中作用的研究. 第四军医大学博士学位论文.2001

88. Hao J, Narayanan K, Ramachandran A, et al. Odontoblast cells immortalized by telomerase produce mineralized dentin－like tissue both in vitro and in vivo, J Biol Chem. 2002;277 (22):19976

89. 陆群. 牙髓干细胞分离培养鉴定和体外诱导分化的研究. 第四军医大学博士学位论文.2002

90. 邓蔓菁、金岩、史俊南等. TGF－β、rhBMP－2 体外诱导 Balb/c 胎鼠下颌突外胚间充质细胞向平滑肌细胞分化. 牙体牙髓牙周病学杂志. 2002;12(10):584

91. 邓蔓菁、金岩、史俊南等. Forskolin 体外诱导 Balb/c 小鼠下颌外胚间充质细胞向神经胶质细胞分化. 牙体牙髓牙周病学杂志. 2002;12(12):639

92. 朱奇、樊明文、边专等. 转化生长因子对体外成牙本质细胞分化的影响,牙体牙髓牙周病学杂志. 2002,12(11):597

93. 王捍国、肖明振、赵守亮等. 永生化人成牙本质细胞样细胞系的建立. 第四军医大学学报. 2003;24(10):876

94. Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100(10): 5807

95. 邓蔓菁、金岩、史俊南等. Balb/c胎鼠下颌突外胚间充质细胞向成骨细胞诱导分化的体外研究.牙体牙髓牙周病学杂志. 2003;13(5):237
96. 张光东、金岩、史俊南等. 胰岛素样生长因子1诱导外胚间充质干细胞向成牙本质细胞样细胞分化. 牙体牙髓牙周病学杂志. 2003;13(2):66
97. 张光东、金岩、史俊南等. SD大鼠面突未分化外胚间充质干细胞的体外培养.临床口腔医学杂志. 2003;19(2):90
98. 张光东、金岩、史俊南等. 大鼠外胚间充质干细胞向成牙本质细胞样细胞定向诱导分化三维诱导模型的建立. 实用口腔医学杂志. 2003;19(3):195
99. 刘世森. 骨形成蛋白4在小鼠牙胚形态发生初期表达和作用的研究. 第四军医大学硕士学位论文. 2003

第十三章　免疫细胞化学在牙髓免疫学研究中的应用

免疫细胞化学(immunocytochemistry)又称免疫组织化学(immunohistochemistry),是利用各种标记物联结到抗体或抗原分子上,以检测和定位组织内相应抗原或抗体的技术。

免疫细胞化学的基本原理是抗原抗体反应,标记化学反应和显色化学反应。它使免疫学的特异性和敏感性与形态学的精密性紧密地结合起来,可以最大限度地保存细胞和组织内待检测物质的抗原性,或采用各种增敏技术,使用高度敏感和高度亲和力的抗体,检出细胞内超微量的抗原成分,用显微镜或电子显微镜观察结果。因此,免疫细胞化学是应用在细胞、分子水平或基因水平的检测技术。

近年,由于分子生物学理论和技术的日益发展,基因探针、核酸分子杂交技术、原位PCR技术、核酸杂交和免疫细胞化学的双标记技术、电镜杂交技术等成为免疫细胞化学技术的新成员,使其将基因重组技术、单克隆抗体技术和免疫细胞化学技术融合在一起,把原位定性、定位和定量技术提高到了更新的水平,形成了现代免疫细胞化学的新技术。

免疫细胞化学的发展对许多领域的研究起到很大的推动作用。毫无例外地,免疫细胞化学在牙髓生物学的应用也为我们开辟了一个新的研究领域。20世纪70年代以来,借助免疫细胞化学技术,使我们得以确定牙髓免疫细胞、细胞外基质、神经递质等生物学成分的性质、定位和分布。随着免疫细胞化学的进展,到目前为止,还发现了与牙髓生理、病理密切相关的,并极富有生物学功能的众多细胞因子,解决了过去传统组织学研究所不能完全解决的问题,揭示了牙髓组织或牙髓细胞的特殊生物学功能。

免疫细胞化学在牙髓生物学的应用已由单纯的形态学研究逐步向机能研究、应用研究和临床实践相结合,例如正常人牙髓和龋病牙髓中的SP、CGRP神经肽的分布特征和动态变化,表明它们与牙髓内血流的调节和痛觉传递密切相关,而且还参与组织的炎症和修复过程。在研究方法上也不断改进,如免疫细胞化学的定量研究由简单的积分法逐渐向与放射免疫测定相结合,与图像分析相结合,测定单位内和(或)每个细胞内免疫反应物含量的变化。由于牙髓免疫细胞化学研究的日益进展,现在,牙髓组织内已证实的物质有蛋白质、肽类、酶类和神经递质等,从而为牙髓生物学增添了极为丰富的内容,开辟了牙髓免疫学的新领域。

免疫细胞化学的全过程包括:抗原提取和纯化;免疫动物或细胞融合(单克隆抗体);抗体提取和效价测定;抗体标记;细胞和组织切片标本的制备;免疫细胞化学反应和显色;观察和记录结果等。由于免疫细胞化学需要最大限度地保存细胞和组织内待检物质的抗原性,以及牙髓外围被牙体硬组织包绕的特殊解剖结构,在免疫细胞化学的全过程中,牙髓组织标本的制备及免疫细胞化学反应和显示即成为至关重要的内容。

组织标本的制备是免疫细胞化学反应和显示能否取得成功的一个重要环节,其主要目的是确保标本能有完整的形态结构并在原位保持抗原的反应性,包括标本的取材、固定和切片。对于牙髓组织,为了既可保存牙髓活性成分的抗原性,又可观察其与牙体组织之间

的解剖位置关系，应用低温脱钙冰冻切片技术是牙髓或牙齿标本制备首选的理想方法。

第一节　牙髓免疫细胞化学技术

一、牙髓免疫细胞化学技术的标本制备

(一)牙齿低温脱钙冰冻切片法

牙齿低温脱钙冰冻切片法包括离体牙齿的固定、脱钙和冰冻切片。

1. 牙齿的固定。

固定剂

(1) PLP 液固定剂：即过碘酸盐 - 赖氨酸 - 多聚甲醛固定剂(periodate - lysine - paraformaldehyde fixative, PLP)。

A 液：

0.1 mol/L 赖氨酸盐酸盐(或盐酸赖氨酸)，0.1 mol/L 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4, pH7.4)

赖氨酸盐酸盐 1.827 g 溶于 50 mL 双蒸水，获得 0.2 mol/L 赖氨酸盐酸盐溶液，然后加入 Na_2HPO_4 至 0.1 mol/L，pH 调至 7.4，补足 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液(PB)至 100mL，使赖氨酸浓度也为 0.1 mol/L。置 4℃保存，可在 2 周内使用。

B 液：

8%多聚甲醛。取多聚甲醛 8 g 加入 100 mL 双蒸水中，加热 60℃ ~ 70℃至溶解，过滤，pH 调至 7.4，置 4 ℃保存。

配制：临用前取 A 液 3 分，B 液 1 分混合，再加入结晶高碘化钠($NaIO_4$)，使其终浓度也为 0.1 mol/L。由于 A、B 两液混合，pH 从约 7.5 降至 6.2，故固定时不需再调 pH。

该液的固定机制是借助过碘酸氧化组织中的糖类形成醛基，通过赖氨酸的双价氨基与醛基结合，从而与糖形成交联。因组织抗原大多数是由蛋白质和糖两部分构成，抗原决定簇位于蛋白部分，故 PLP 固定液可选择性地使糖类固定，既稳定了抗原，又不影响在组织中的位置关系。

Mclean 和 Nakane 等认为：最佳的 PLP 混合液是含 0.01 mol/L 的过碘酸盐，0.075 mol/L 的赖氨酸，2 %的多聚甲醛和 0.037 mol/L 的磷酸缓冲液。

PLP 固定液对组织结构、超微结构和许多抗原的抗原性保存较好，尤其是保存抗原性方面是目前较受欢迎的固定剂。

(2)4%多聚甲醛磷酸缓冲固定剂(pH7.3)。

配方：

多聚甲醛	40 g
0.1 mol/L 磷酸缓冲液至	1000 mL

配制方法：称取 40 g 多聚甲醛，置三角烧瓶中，加入 500 ~ 800 mL 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(phosphate buffer, PB)，加热至 60℃左右，持续搅拌，使粉完全溶解，通常需滴加少许 0.5 mol/L的 NaOH 液才能使溶液清亮，最后补足 0.1 mol/L 的 PB 至 1 000 mL，充分混匀。

该固定剂较适合于光镜免疫细胞化学研究，最好是动物经灌注固定取材后，继续浸泡固定 2 ~ 24 h 。而且，该固定剂较为温和，适于组织标本长期保存。

PDG

(3)4%多聚甲醛－磷酸二氢钠－氢氧化钠固定液。

配方：

A 液	多聚甲醛	40	g
	蒸馏水	400	mL
B 液	$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	16.88	g
	蒸馏水	300	mL
C 液	NaOH	3.86	g
	蒸馏水	200	mL

配制方法：A 液在 500 mL 三角烧瓶中配置，至多聚甲醛完全溶解后冷却待用。B、C 液分别配制后将 B 液倒入 C 液中，混合后再加入 A 液，以 0.5 mol/L NaOH 或 0.5 mol/L HCl 将 pH 调至 7.2～7.4，最后补充蒸馏水至 1 000 mL 充分混合，4℃冰箱保存备用。

该固定剂适于光镜和电镜免疫细胞化学研究，用于免疫电镜时，最好加入少量新鲜配制的戊二醛，使其最终浓度为 0.5%～1.0%。该固定剂较温和，适于组织的长期保存。标本于该固定剂中，4℃冰箱保存数月仍可获得满意的染色效果。

固定后的离体牙依次于 4℃下经 5%、10%、15%甘油磷酸盐缓冲生理盐水洗涤 15 min，移入 －5 ℃脱钙液中脱钙。

(4)多聚甲醛－戊二醛固定剂(PG 固定剂)。

配制方法：用 0.1mol/L pH7.4 PB 稀释 10%多聚甲醛液，使最终浓度为 1.0%，再加戊二醛至含量为 0.0125%。

(5)Bouin 液和改良 Bouin 液。

配方：

饱和苦味酸	750 mL
40%甲醛	250 mL
冰醋酸	50 mL

配制方法：先将饱和苦味酸过滤，加入甲醛，混合后存于 4℃冰箱中备用，临用前再加入冰醋酸。改良 Bouin 液即不加冰醋酸。

该固定液为组织学、病理学常用固定剂之一，组织穿透力较强，固定较好，结构完整。但因 pH 为 3～3.5，偏酸性，对抗原有一定损害，且组织收缩较明显，故不适于组织标本的长期保存，而且操作时应避免吸入或与皮肤接触。

(6)Karnovsky 固定液(pH7.3)。

配方：

多聚甲醛	30.0 g
25%戊二醛	80.0 mL
0.1 mol/L PB	至 1 000.0 mL

配制方法：先将多聚甲醛溶于 0.1mol/L PB 中，再加入戊二醛，最后加 PB 至 1 000.0 mL 混匀。

该固定剂适于免疫电镜标本固定，用该固定液在 4℃短时间固定，比在较低浓度的戊二醛中长时间固定能更好地保存组织的抗原和细微结构。固定时最好先灌注固定，而后浸泡固定 10～30 min。用缓冲液漂洗后即可用树脂包埋或经蔗糖溶液处理后用于恒冷切片。

在选择固定剂时需注意,不同的蛋白质抗原对固定剂的敏感性不尽相同,对某一种抗原适合的固定剂不一定对另一种抗原适合,而且由于所用的抗血清不同,亦会影响固定剂的选择。为此,需探索既能保存标本的精细结构,又能保存待检抗原的免疫学活性的固定剂。

2. 牙齿的脱钙。

脱钙液

(1)EDTA 脱钙液。

配方:

EDTA-2Na (乙二胺四乙酸二钠)	14.50 g
氢氧化钠	1.25 g
甘油	15.00 mL
双蒸水	加至 1 000.00 mL

配制方法:将上述 3 种成分混匀而后加双蒸水,并使 pH 值在 7.1~7.4 范围内。

EDTA 可有效地软化牙本质,对牙本质有溶解作用。脱钙时间为:人牙约需 5~7 周,乳牙 4~5 周,猫牙 3~4 周,大鼠牙 2~3 周。

脱钙结束后转入蔗糖、甘油缓冲液和聚乙烯二醇溶液中处理。

15%蔗糖加 15%甘油 PBS, -5℃, 6 h

20%蔗糖加 10%甘油 PBS, 4℃, 1 h

20%蔗糖加 5%甘油 PBS, 4℃, 1 h

20%蔗糖加 PBS, 4℃, 1 h

20%聚乙烯二醇溶液中 4℃浸透 10 min

蔗糖、聚乙烯二醇和甘油是一种冷冻保护剂,它们可以与水结合,减少标本中的水分子,防止冷冻过程中标本内冰晶生成所致的组织结构形态改变。同时,甘油可以降低脱钙液的冰点,保证脱钙的顺利进行。蔗糖和聚乙烯二醇能够改善冰冻切片的可塑性,对于脱钙标本至关重要。

脱钙和处理后的标本或置入液氮内骤冷,保存备用,或用 O.C.T 糊剂包埋后置入恒冷冰冻切片机连续切片(5~10 μm)。

(2)Krinstensen 脱钙液。

配方:

甲酸钠	52.2 g
甲酸	174.2 mL
双蒸水	1000.0 mL

配制方法:甲酸钠、甲酸分别溶于 500 mL 双蒸水中后,混匀,4℃备用。可保存 2~3 个月。

3. 牙齿标本低温脱钙冰冻切片的处理流程。

流程一:

牙齿拔除后生理盐水浸洗拭干

↓

PLP 固定液中固定 6~10 h

↓

5%、10%、15%甘油磷酸盐缓冲液各洗涤 15 min

↓

EDTA 脱钙液脱钙 5～7 周

↓

15%蔗糖、15%甘油 PBS，6 h

↓

20%蔗糖、10%甘油 PBS，1 h

↓

20%蔗糖、5%甘油 PBS，1 h

↓

20%蔗糖 PBS，1 h

↓

20%聚乙烯二醇溶液 10 min

↓

O.C.T 糊剂包埋

↓

恒冷切片机制备 5～10 μm 连续冰冻切片

以上步骤除脱钙和 15%蔗糖、15%甘油 PBS 处理是在 -5℃进行外，其余均在 4℃中进行。

流程二：

牙齿拔除后生理盐水浸洗拭干

↓

4%多聚甲醛缓冲固定液固定，4℃，24 h

↓

制备牙齿磨片

↓

4%多聚甲醛缓冲固定液固定，4℃，24 h

↓

Krinstensen's 脱钙液脱钙，4℃，2～3 周
（隔 2～3 d 换液 1 次）

↓

流水冲洗 2～4 h

↓

双蒸水浸洗过夜

↓

0.1 mol/L PB，4℃，24 h

↓

32%蔗糖缓冲液内，4℃，24 h

↓

制备连续冰冻切片

若将切片制备为 50 μm 厚，置具有 pH7.4，0.01 mol/L PBS 液的网格中备用，则可用于漂染。

牙齿标本经上述固定、脱钙之后，也可经系列酒精脱水，浸蜡包埋，制备石蜡切片。

4．EDTA 低温脱钙制备标本的注意事项。

(1) 体积较大的牙齿可以在固定后，于低温环境下（如冰槽、冰壶等）用涡轮钻磨除部分牙釉质，涡轮机的冷却水最好置冰箱内预冷。标本体积越小，脱钙时间越短。

(2) 脱钙时应勤换脱钙剂，尽量缩短脱钙时间，才能使抗原活性的保存足以保证实验结果的成功观察，通常 2～3 d 更换 1 次。

(3) 固定剂和脱钙剂的 pH 值均应严格控制在 7.1～7.4 之间，使之能更好地保存细胞表面抗原。

(4) 进行切片时，冰冻切片包埋剂（O.C.T 糊剂）应充分包埋整个牙体，使牙体周围包埋剂厚度基本一致，以避免切片过程中硬组织与牙髓组织分离。

(5) 为防止脱片，需进行载玻片预处理和涂黏附剂。

载玻片处理：载玻片必须经过清洁液浸泡 12～24 h，流水充分漂洗后用蒸馏水洗 5 遍以上，浸泡于 95%酒精内 2 h。再用洁净的绸布擦干或用红外线烤箱烤干，贮放备用。盖玻片很薄，必须缩短以上程序，清洁液浸泡只须 2 h，流水冲洗或蒸馏水清洗时勿损伤玻片等。

5．黏附剂。

黏附剂的种类较多，常用的有铬矾明胶、树脂胶（又称白色乳胶）、甘油明胶、甲醛明胶等。

(1) 铬矾明胶液。

配方：

铬矾[$CrK(SO4)_2 \cdot 12H_2O$]	0.5 g
明胶	5.0 g
双蒸水	至 1 000.0 mL

或含铬矾 0.01%，明胶 0.1%

配制方法：在 1 000 mL 的烧杯或烧瓶中，以 500～800 mL 双蒸水加温溶解明胶（约 65℃），完全溶解并冷却后再加入铬矾。温度过高易使明胶烧糊，包被玻片时最好控制水温在 70℃，并过滤后使用。

配制的铬矾明胶可在 4℃保存。

为防止脱钙冰冻切片的牙体硬组织脱片，可采用铬矾明胶液双重黏附处理，即切片充分吹干后，用注射针头或毛细吸管吸取黏附剂（在 40℃以下），沿标本外缘和硬组织表面准确涂布一薄层，再充分吹干后进行染色。

(2)白色乳胶。

即木工用乳胶，或进口白色树脂胶，或国产聚醋酸乙烯乳胶液，使用浓度为 1%～2%，以蒸馏水稀释即可。

(3)甘油明胶。

混匀后涂在载玻片上,切片贴附后置有副醛的干燥器皿内,加热至 80℃ 1 h。

(4)甲醛明胶。

配方:

40%甲醛	2.5 mL
明胶	0.5 g
蒸馏水	至 100.0 mL

配制方法:用约 80 mL 蒸馏水加热溶解明胶,待明胶完全溶化后,加入甲醛,将蒸馏水加至 100 mL 混匀即可。

6. 牙髓组织标本的制备方法。

(1) 取材:将新鲜拔除的离体牙立即在低温环境下沿着牙轴方向纵形劈开,轻巧、仔细、完整地剥离出牙髓。体内牙齿,前牙可于舌面开髓,用髓针完整拔出牙髓;后牙可于殆面制洞,开髓和揭去髓顶,手术切取冠髓。此种取材,难以准确辨别牙髓和牙体间的解剖位置关系,而且对牙髓组织多有损伤。

为充分保存组织的抗原性,牙髓标本离体后应立即作处理,或立即速冻,进行冰冻切片或立即用固定剂固定,进行脱水、浸蜡、包埋石蜡切片,如不能迅速制片,可贮存于液氮罐内或 -70℃冰箱内备用。取出的牙髓立即用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 洗去表面血污,用 O.C.T 糊剂包埋,液氮速冻,-80℃冻存备用。

(2) 固定:固定剂同上,固定时间依固定剂性能而定,在低温环境(4℃)进行,一般需 2~12 h。

(3) 石蜡切片的制备:用于免疫细胞化学研究的石蜡制片与常规制片略有不同:

①脱水、透明等过程需在 4℃下进行,以尽量减少组织抗原的损失。

②在低温石蜡中包埋,即浸蜡、包埋过程中,石蜡温度保持在 60℃以下,以溶点低的软蜡为好。

③石蜡切片应放入 37℃恒温箱过夜,经过这样的烤片可减少染色中脱片现象。

④切片如需长期贮存,可存放于 4℃冰箱内备用。因牙髓组织块小,可用快速石蜡包埋切片,全过程只需约 4 h。

石蜡制片的优点较多,如组织结构保存良好,结构清晰,抗原定位准确。但是,制片过程中经过酒精、二甲苯等有机溶剂处理,组织内抗原活性丢失较多,为了保存更多的抗原活性,可采取冰冻干燥包埋法(freeze drying embedding method),即将新鲜组织低温速冻,利用冰冻干燥机在真空、低温条件下排除组织内水分,然后用甲醛蒸气固定干燥的组织,最后将组织浸蜡,包埋,切片,此法可用于免疫荧光标记、免疫酶标记及放射自显影等。

二、牙髓免疫细胞化学染色法

牙髓免疫细胞化学可用免疫荧光法,酶桥法,过氧化物酶抗过氧化物酶法(perioxidase antiperoxidase meuthod, PAP 法)等。

随着免疫细胞化学的广泛应用和迅猛发展,继荧光素、酶标记抗体技术后,20 世纪 70 年代,建立了非标记抗体酶法,包括酶桥法和 PAP 法。80 年代后,相继发现了多种亲和物质,如植物凝集素(lectins)与糖结合物(glacol conjngates),葡萄球菌 A 蛋白(staphylocal protein A, SPA)

与 IgG，生物素(biotin)与卵白素(avidin)，激素、脂质与受体等。这些物质是一些有多价结合能力的物质，不但亲和物质之间有高度亲和力，而且可以与标记物如荧光素、酶、同位素、铁蛋白等相结合。利用两种物质之间相互结合的化学反应而进行的细胞化学检测称为亲和细胞化学(Affinity cytochemistry)。免疫细胞化学中引入亲和细胞化学，则可使其敏感性得到进一步提高，更有利于微量抗原或抗体在细胞和亚细胞水平的定位。其中卵白素－生物素免疫染色系统或称为抗生物素－生物素免疫染色法是目前牙髓免疫细胞化学研究中应用最普遍、敏感性最高的染色法。

1．抗生物素－生物素－过氧化物酶复合物技术(avidin biotin－peroxidase Complex techniqne，简称 ABC 技术或 ABC 法)，其特点是利用抗生物素分别连接生物素标记的第二抗体和生物素标记的酶。第一抗体不被标记物所标记，生物素标记的第二抗体与 ABC 复合物相连接。复合物将过氧化物酶结合在生物素上，再将生物素－过氧化物酶连接物与过量的抗生物素蛋白反应而制备的，最后进行显色反应而使检测物定位。

在 ABC 法中，抗生物素作为桥连接于生物素标记的酶和生物素标记的抗体之间，而生物素标记的过氧化物酶分子又可作为桥连接于抗生物素分子间，于是形成了一个含有三个以上过氧化物酶分子的网络状复合物，使敏感性极大提高，较 PAP 法约高 20～40 倍，能显示 PAP 法所不能显示的抗原。由于 ABC 法敏感性高，第一抗体和第二抗体都可被稀释至尽可能少的程度，减少了非特异染色，使其特异性强，背景染色淡；而且生物素与抗生物素具有多种示踪物结合能力，可用于双重或多重免疫染色；由于生物素－抗生物素染色药盒的商品化或 ABC 试剂的应用，使其方法简便，节约时间。

2．ABC 染色法的操作步骤。

步骤一：

取出牙髓恒冷冰冻切片，室温干燥 1 h

↓

50%冷丙酮固定 30 s

↓

100%冷丙酮固定 5 min

↓

1%牛血清加 5%正常羊血清室温下作用 30 min

↓

第一抗体，37℃湿盒孵育 1 h

↓

生物素标记的第二抗体(1:200)，37℃湿盒 45 min

↓

0.3% H_2O_2－PBS 封闭内源性过氧化物酶，5 min(暗室内)

↓

ABC 复合物(1:200) 37℃湿盒孵育 45 min

↓

0.05%DAB－0.01% H_2O_2－0.05 mol/L Tris－HCl(pH 7.6)

↓

镜下控制显色反应

↓

(上述各步骤之后均用 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 振洗 3 次,每次各 5 min)

↓

苏木素轻度复染

↓

梯度乙醇脱水,二甲苯透明

↓

树脂封固,光镜观察和计数

步骤二:

将冰冻切片置于含 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 液网格内

↓

0.01%过氧化氢甲醇液室温下封闭 30 min

↓

0.03% Triton-X-100 PBS 液室温下作用 30 min

↓

第一抗体,4℃孵育 72 h

↓

生物素标记的第二抗体(1:200)室温孵育 4 h

↓

ABC 复合物(1:200)室温孵育 4 h

↓

(上述各步骤之后均用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 振洗 3 次,每次各 5 min)

↓

新鲜配制的 DAB-0.25%硫酸镍铵醋酸缓冲液
显色,镜下控制反应强度,适时终止显色

↓

裱片于明胶载玻片上自然晾干

↓

梯度乙醇脱水,二甲苯透明

↓

DPX 胶封固,晾干

↓

光镜下观察

以上步骤为漂染方式,适宜神经系统抗原分布研究。

步骤三:

人牙拔除后立即劈冠,取出牙髓

↓

Bouin 固定液 4 h

↓

梯度乙醇脱水

↓

石蜡包埋

↓

石蜡切片，厚 4 μm

↓

常规脱蜡，梯度乙醇至水

↓

3% H_2O_2 甲醇，去除内源酶

↓

正常血清孵育 15 min

↓

第一抗体，4℃ 48 h

↓

生物素标记的第二抗体，37℃ 1 h

↓

ABC 复合物，室温 40 min

（以上各步骤之后均用 pH 7.4，0.01 mol/L PBS 振洗 3 次，每次各 5 min）

↓

0.01% H_2O_2 + DAB 溶液显色

↓

梯度乙醇脱水，二甲苯透明

↓

DPX 胶封片

↓

光镜观察

阳性对照：已知抗原阳性的组织切片

阴性对照：用正常血清稀释液代替第一抗体

其余与上述步骤相同。

3．注意事项：

(1)石蜡切片需经脱蜡、梯度乙醇至水。

(2)ABC 复合物的配制，生物素与抗生物素之比为 1:4 时，能获最佳满意效果，即抗生物素 10 μg/mL 加生物素 2.5 μg/mL，应用 0.05 mol/L Tris－HCl 液，pH 7.6，在应用前 30 min 配制。ABC 试剂保存温度以 4℃为佳。

(3)阳性、阴性对照同步进行上述染色，目的在于证实阳性结果的特异性，排除可疑的

非特异性。

阳性对照是用已知的抗原阳性的切片与待检标本同时进行染色，对照片应为阳性结果，证明全过程符合要求。尤其当待检标本呈阳性结果时，阳性对照尤为重要。

阴性对照是用确证不含已知抗原的标本作对照，应呈阴性结果，为阴性对照的一种。其实空白、替代、吸收和抑制试验都属阴性对照。当待检标本呈阳性结果时，阴性对照就更加重要，用以排除假阳性。通常应用 PBS 或正常血清代替第一抗体，省去特异性第一抗体，以检查组织细胞与标记抗体或桥抗体之间有无非特异性第一抗体，为阴性对照。

三、牙髓免疫细胞化学染色的常用试剂

1. 缓冲液。

(1) 0.2 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PB)。

配方：

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$

$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$

配制：配时常分别配制 0.2 mol/L 的 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 和 0.2 mol/L 的 $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$，两者按一定比例混合即成 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液(PB)，根据需要还可配制不同浓度的 PB 和 PBS。

0.2 mol/L $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$：称取 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 31.2g 或 $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 27.6g，加蒸馏水至1 000 mL 溶解。

0.2 mol/L $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$：称取 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 71.632g 或 $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 53.6 g，或 $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 35.6 g，加双蒸水至 1 000 mL 溶解。

0.2 mol/L pH7.4 的 PB 配制：0.2 mol/L $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 19 mL 和 0.2 mol/L Na_2HPO_4 81 mL，充分混合(pH 约 7.4～7.5)，若 pH 偏高或偏低，可改变二者比例加以调整，室温保存。

(2)0.01 mol/L 磷酸盐缓冲生理盐水(phosphate buffered saline, PBS)。

配方：

0.2mol PB	50 mL
NaCl	8.5～9 g (约 0.15 mol/L)
双蒸水	至 1 000 mL

配制：将 0.2 mol/L PB 50 mL 和 NaCl 8.5～9 g 置 1 000 mL 的容量瓶中，加双蒸水至 1 000 mL，充分摇匀即可，若拟配制 0.02 mol/L 的 PBS，则将 PB 量加倍即可。

PB 和 PBS 是免疫细胞化学实验中最为常用的缓冲液，0.01 mol/L PBS 主要用于漂洗组织标本，稀释血清等，pH 值应在 7.24～7.35 之间。0.1 mol/L 的 PB 常用于配制固定液、蔗糖等。通常，将 0.2 mol/L PB 稀释成 0.01 mol/L PBS 时，常可达到要求的 pH 值。

(3)0.5 mol/L pH 7.6 Tris－HCl 缓冲液 (Tris buffered, TB)。

配方：

Tris(三羟甲基氨基甲烷)	60.57 g
0.5 mol/L HCl	约 420 mL
双蒸水	至 1 000 mL

配制：先以 300～500 mL 双蒸水溶解 Tris，加入 HCl 之后再用 0.5 mol/L HCl 的 NaOH 将

pH 调至 7.6,最后加双蒸水至 1 000 mL。此液为储备液,4℃冰箱保存,常用的 0.05 mol/L Tris - HCl 缓冲液即为 10 倍稀释的储备液。该液主要用于配制 Tris 缓冲生理盐水,DAB 显色液等。

(4) Tris 缓冲生理盐水(Tris buffered Saline, TBS)。

配方:

0.5 mol/L Tris - HCl 缓冲液	100	mL
NaCl	3.5 ~ 9	g(0.15 mol/L)
双蒸水	至 1 000	mL

配制:先以少量双蒸水溶解 NaCl,再加 Tris - HCl 缓冲液,最后加蒸水至 1 000 mL,充分摇匀使 Tris 终浓度为 0.05 mol/L。

TBS 主要用于漂洗标本,常用于免疫酶技术。

(5)Tris - PBS(Tris - PBS)。

配方:

Triton - X - 100	10	mL(1%)或 3 mL(0.3%)
0.5 mol/L pH7.6 Tris - HCl 缓冲液	1 000	mL
(或 0.2 mol/L pH 7.4 PB	50	mL)
NaCl	8.5 ~ 9	g
双蒸水	至 1 000	mL

配制:用少量双蒸水溶解 NaCl 后,加入 Triton - X - 100 和 Tris 缓冲液或 PB,最后加双蒸水至 1 000 mL,充分混匀。

常用浓度为 1%或 3%,前者主要用于漂洗标本,后者主要用于稀释血清。

(6) 30% Triton - X - 100(聚乙二醇辛基醚)。

配方:

Triton X - 100	28.2 mL
0.01mol/L pH 7.3 的 PBS	72.8 mL
或 0.05mol/L pH 7.4 的 TBS	72.8 mL

配制:将 Triton X - 100 与 PBS 或 TBS 混合,置 37℃ ~ 40℃水浴中 2 ~ 3 h,使其充分混合。此液为储备液,常用浓度为 1%或 0.3%,临用时稀释即可。

Triton X - 100 是一种非离子型表面活性剂,是常用的去污剂,可溶解脂质,以增加抗体对细胞膜的通透性。常用 1%溶液漂洗组织标本。

2. 显色液。

DAB 显色液(diaminobenzidine, DAB, 即 3,3 - 二氨基联苯联,常用四盐酸盐)

配方:

DAB	50 mg
0.05 mol/L TB	100 mL
30% H_2O_2	30 ~ 40 μL

配制:先以少量 TB 溶解 DAB,然后加入余量 TB,充分摇匀,使 DAB 终浓度为 0.05%,过滤后显色前加入 30% H_2O_2 30 ~ 40 μL,使其终浓度为 0.01%。

配时应注意:DAB 需完全溶解,否则未溶解的颗粒沉淀于标本上影响观察;DAB 浓度不

宜过高，否则显色液呈棕色，增加背景染色；DAB 有致癌作用，操作时应戴手套，尽量避免与皮肤直接接触，用后及时彻底冲洗，接触 DAB 的器皿应经洗液浸泡 24h 后使用。

3. 封固剂。

(1)甘油 - TBS 或甘油 - PBS。

配方：

①	甘油	90 mL
	0.01 mol/L TBS	10 mL
②	甘油	75 mL
	0.01 mol/L PBS	25 mL

配制：分别将二组配方充分混合后，置 4℃冰箱，待气泡排除后方可使用。

(2)甘油一明胶。

配方：

明　胶	10 g
甘　油	12 mL
蒸馏水	100 mL
香草酚	少许

配制：将明胶充分溶解于温热的蒸馏水中，过滤，再加甘油混合均匀，加香草酚少许是为了防腐。

(3) DPX。

配方：

Distrenze	10 g
酸二酊	5 mL
二甲苯	35 mL

DPX 现有商品出售，可直接应用，若过于黏稠，可加少量二甲苯稀释后应用，DPX 为中性封固剂，应用时尽量使其为一薄层，以防组织收缩。

四、牙髓的免疫电镜技术

免疫电镜技术是免疫细胞化学与各种电镜技术结合，在高分辨力的水平上，定位细胞器等超微结构中的抗原而形成的技术，免疫细胞化学不仅可显示免疫反应中有关物质在超微结构中的定位，而且可以显示有关物质和超微结构之间的相互关系。在鉴定识别抗原物质的性质方面，为分子生物学水平研究提供可靠的依据，是当前发展免疫分子病理学重要的手段之一。近年，随着免疫细胞化学的发展，牙髓的免疫电镜研究也有了新的进展。牙髓免疫电镜技术的步骤有标本制备、免疫染色、电镜标本制作和电镜观察等。

1. 标本制备。

标本选自需拔除的待检牙齿，拔除后将离体牙立即在低温下劈开，取出牙髓，置 PLP 固定液，4℃下固定 6 ~ 8 h，液氮速冻后制作 30 μm 冰冻切片，放入 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 中漂洗待染。

2. 免疫染色。

牙髓免疫电镜标本可采用包埋前 ABC 技术染色，全部染色过程均在小瓶内漂染，染色

流程如下：

将冰冻切片置入含有 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 液的网格

↓

第一抗体，室温微振 1 h，4℃ 24 h，摇动数次

↓

PBS 漂洗，4℃ 1 h，换液数次

↓

生物素标记的第二抗体，室温下微振 1 h，4℃ 4 h

↓

0.03% H_2O_2 - PBS 暗室内封闭 10 min

↓

PBS 漂洗，4℃ 1 h，换液数次

↓

ABC 复合物室温下振荡 10 min，4℃ 4 h

↓

0.05 mol/L pH 7.6 Tris - HCl 缓冲液漂洗 10 min

↓

0.01% H_2O_2 - Tris - HCl - DAB 镜下控制显色 15 ~ 20 min

3. 电镜标本制作。

低倍镜下挑选阳性着色部位，初步修整

↓

1% O_sO_4 固定 1 h，PBS 漂洗过夜

↓

系列乙醇脱水，丙酮固定 10 min

↓

丙酮加 Epon 812 环氧树脂包埋剂(1:1) 15 min

↓

纯包埋剂浸透 30 min

↓

将样本置预置的包埋树脂柱上展平

↓

硅化玻璃片加压(100 g)

↓

过夜，60℃聚合 48 h

↓

将包埋柱置显微镜下，挑选阳性细胞，修整

↓

超薄切片

↓

柠檬酸铀染 2 min，双蒸水洗

↓

醋酸钠染 2 min，60℃烘干

↓

电镜观察

4. 注意事项。

(1) 免疫电镜标本的取材要求迅速、精细。牙髓标本的采集多为劈开牙齿取出牙髓。

(2) 免疫电镜标本的固定是一个重要问题，要求标本新鲜并迅速作适当固定，既可保存抗原的良好性能，又能保存细胞及抗原物质微细结构，固定剂的应用是根据抗原性保存的需要和超微结构的良好保存来选择。在众多的固定液中，过碘酸盐－赖氨酸－多聚甲醛固定液（PLP 固定液）是首选的固定液，它能保存免疫球蛋白的抗原性及细胞的超微结构，但赖氨酸价格较高，不如多聚甲醛－戊二醛固定液经济、简便、效果佳。

(3) 包埋前染色，即先行免疫染色，在解剖显微镜下将免疫反应阳性部位取出，整修成小块，按常规电镜方法处理，经锇酸固定，脱水，包埋。如果特异性免疫反应的范围太小，为了准确定位，可作第二次包埋，即第一次包埋时将组织置于两层 thermanox 塑料片之间，中央环氧树脂包埋，如夹心面包式，进行高温聚合，然后再在解剖显微镜下取观察部位作第二次包埋。包埋前染色的组织，以中层较为理想。

包埋前染色法特别适用于含抗原量较少的组织，其优点是：

①切片染色前不经过锇酸后固定、脱水及树脂包埋等过程，抗原未被破坏，易于获得良好的免疫反应。

②可在免疫反应阳性部位定位超薄切片，提高电镜下的检出率。

(4) 超薄冰冻切片也适合牙髓免疫电镜研究，将组织置于 2.3 mol/L 蔗糖液中，以液氮速冻，在冰冻超薄切片机上切片，切片厚度可略厚于常规树脂切片。由于冰冻超薄切片不需经固定、脱水包埋等步骤，直接进行免疫染色，所以抗原保存较好，兼有包埋前或后的优点。

(5) 牙髓免疫电镜实验时需进行对照试验。

第二节　原位杂交组织化学

原位杂交是将分子杂交与组织化学结合的方法，也称杂交组织化学（hybridization histochemistry）、细胞杂交（cytological hybridization）或原位杂交组织化学（in situ hybridization histochemistry，ISHH）。它是用标记的 DNA 或 RNA 为探针，在原位检测组织内特定的 DNA 或 RNA 序列。其基本原理是，应用含有互补顺序的标记 DNA 或 RNA 片段，即探针，在适宜的条件下与细胞内的 DNA 或 RNA 形成稳定的杂交体。因而，根据所用的探针和靶核酸的不同，原位杂交可分为 DNA－DNA 杂交、DNA－RNA 杂交和 RNA－RNA 杂交三类。根据探针的标记物是否能直接被检测，原位杂交又可分为直接法和间接法。其中，直接法的探针是用放射性同位素、荧光素或一些酶标记探针与组织细胞内的靶核酸所形成的杂交体，分别通过放射自显影、荧光显微镜或成色的酶促反应直接显示。间接法的探针一般是用半抗原标记，最后通过免疫组织化学对半抗原定位，间接显示探针与组织细胞内靶核酸所形成的

杂交体。

由于原位杂交中用于组织细胞内特定的 DNA 或 mRNA 顺序定位的特殊试剂是探针，因而在进行原位杂交技术之前必须制备探针和标记探针。核酸探针的制备是分子杂交的关键。根据核酸探针的核酸性质区分，探针的种类有 DNA 探针、RNA 探针、cDNA 探针、cRNA 探针及寡核苷酸探针等。标记探针的方法很多，近年来，地高辛(digoxigenenin)配基随机标记法标记的探针已广泛应用于原位杂交技术。它与放射性标记相比，地高辛标记探针对人体无害，不受半衰期限制，探针可长期保存。它与生物素标记相比，不受组织细胞中内源性生物素的干扰，敏感性高。地高辛具有灵敏度和分辨率高，反应产物颜色鲜艳，反差好，背景染色低，制备探针可长期保存，对人体无害等优点。目前已有地高辛检测试剂盒，参考其说明书即可进行实验。如参照 DIG DNA Labeling and Dection kit 说明书介绍的方法，用随机引物法将 DIG 标记的 dUTR 掺入到基因探针上进行原位杂交。

原位杂交组织化学技术的基本方法为杂交前准备、杂交反应、杂交后处理和显示。

一、杂交前准备

(一) 标本的取材(同前)

(二)组织的固定

在固定剂的应用和选择上需兼顾到 3 个方面：保持细胞结构、最大限度地保持细胞内 DNA 和 RNA 水平，使探针易进入细胞或组织。DNA 是比较稳定的，mRNA 是相对稳定的，但易为酶合成和降解，RNA 却绝然不同，非常易被降解。因此，对于 DNA 的定位来说，固定剂的种类和浓度并不十分重要，相反，在 RNA 的定位上，如果使 RNA 的降解减少到最低限度，那么，固定剂的种类、浓度和固定时间则十分重要。为了避免组织中核酸的降解，保存组织的形态结构，以及增加组织的通透性，常需化学固定剂。化学固定剂有沉淀固定剂和交联固定剂两类，常用沉淀固定剂有乙醇、甲醇和丙醇等，交联固定剂有多聚甲醛、甲醛和戊二醛等。在众多的固定剂中，一般认为 4% 多聚甲醛对采用 cRNA 探针检测 mRNA 的组织固定较为适宜。它既能有效地保存靶 RNA 和组织的形态结构，又可使组织具有一定的通透性，组织与固定剂的体积比，不应低于 1:10，固定时间与上述免疫细胞化学法的固定时间相同。

组织固定后需用 PBS 漂洗约 4～5 h，每小时更换洗液，或过夜，而后再按常规进行石蜡包埋。如拟制冰冻切片，组织块则用含 15% 蔗糖的 PBS 溶液漂洗 4～5 h 或过夜。

(三)原位杂交的标本制备

有石蜡切片、冰冻切片和细胞培养等。为防止细胞或细胞标本在杂交过程中脱落，载玻片需用酸或去污剂洗涤，清水充分淋洗后再用蒸馏水淋洗。洗涤后浸渍铬矾明胶液，干燥保存备用。

新鲜组织制备的冰冻切片，需先用固定剂固定(4% 多聚甲醛固定 10 min)，然后置 37℃ 干燥 4 h 或过夜后再行原位杂交。制成的石蜡切片置于 52℃ 烤箱过夜，随即可进行原位杂交。

(四)杂交前处理

主要指用交联固定剂固定的标本，尤其是福尔马林固定的石蜡切片标本，需经杂交前处理。其目的是提高组织的通透性，增加靶核酸的可及性，及防止 RNA 或 DNA 探针与细

胞、组织或载片之间的非特异性结合，从而增强信号，减低背景。其内容包括脱蜡，去污剂处理，蛋白酶处理，酸酐处理和酸处理，不含探针的杂交液孵育以及内源性酶抑制等步骤。

石蜡标本的脱蜡是先置入二甲苯 37℃，30 min 后，再转入新鲜二甲苯，室温 10 min，然后经浓度逐渐下降的乙醇至水。

去污处理的常用去污剂是 Triton X－100 脱蜡后，切片先用 PBS 洗 2 次，每次 3～5 min，接着将切片浸入含 0.2% Triton X－100 的 PBS 内 15 min，再用 PBS 洗 2 次。去污剂处理后可增加组织的通透性，利于探针进入组织细胞。

蛋白酶处理的常用蛋白酶是蛋白酶 K(protenase K)、链霉蛋白酶(pronase)和胃蛋白酶(pepsin)。蛋白酶 K 溶液 37℃孵育 20～30 min，浓度为 1 μg/mL，用 0.1 mol/L Tris－HCl pH 8.0 缓冲液和 50 mmol/L EDTA，pH8.0 配制。链霉蛋白酶溶液室温孵育 5 min，浓度为 1～2 mg/mL，溶于含 5 mmol/L EDTA 的 0.05 mol/L Tris－HCl pH 7.6 缓冲液中。胃蛋白酶溶液 37℃孵育 15 min，浓度为 0.4%(重量/体积)，溶于 0.01 mol/L HCl。

为了终止蛋白酶消化反应并保持组织结构，通常需用 4% 多聚甲醛再固定。在蛋白酶 K 消化后，多应用 0.1 mol/L 的甘氨酸 PBS 清洗以终止消化作用。为了防止探针与组织中碱性蛋白之间的静电结合，减少非特异性染色，杂交前可用 0.25% 乙酸酐或 0.2 mol/L 稀盐酸处理 10 min。

(五)预杂交(prehybridization)

是减低背景染色的有效手段。预杂交液是不含探针和硫酸葡聚糖(dextran sulphate)的溶液，将组织切片浸入预杂交液中可达到封闭非特异性杂交点的目的，从而减低背景染色。

杂交前的准备是为杂交成功打下基础而获得满意的实验结果的必要步骤，从而使其达到增加组织通透性的目的，在杂交反应中核酸探针能进入细胞或组织内并与靶核酸相结合。

二、杂交反应(hybridization)

杂交反应是原位杂交中关键的环节，在杂交反应中需注意以下几点。

(一)进行杂交反应的探针和靶核酸都必须是单链的。如果用双链 DNA 探针检测 DNA，则探针和靶核酸都必须先解链或先变性，即将含有双链探针的杂交液加在组织标本上，再将载玻片加热至 95℃ 5～15 min，这样可使探针和靶 DNA 同时变性，变成单链的探针随之与靶 DNA 之间进行杂交反应。如果用单链的探针来检测靶 RNA，一般不需要变性。

(二)进行杂交反应的杂交液除含一定浓度的标记探针外，还需含有较高浓度的盐、甲酰胺、硫酸葡聚糖、牛血清白蛋白及载体 DNA 或 RNA 等。杂交液中含较高浓度的 Na^+ 可使杂交率增加；还可减低探针与组织标本之间的静电结合。甲酰胺可使杂交温度降低。杂交液中加适量甲酰胺(50%左右)，可避免因杂交温度过高而引起的组织形态破坏及标本脱落。硫酸葡聚糖(约占 10%)能与水结合，从而减少杂交液的有效体积，提高探针的有效浓度，提高杂交率。在杂交液中加入牛血清白蛋白及载体 DNA 或 RNA 等，都是为了阻断探针与组织结构成分之间的非特异结合，减低背景染色。杂交液的量要适当，以 10～20 μL 每片为宜。杂交液过量不仅造成浪费，而且易致盖玻片滑动脱落，或导致高背景染色等，影响杂交效果。

(三)掌握最佳探针浓度。在原位杂交反应中，探针的浓度远高于组织中靶核酸的浓

度。根据国内外实验工作者的经验，掌握探针浓度的最佳原则应是用最低探针浓度达到与靶核苷酸的最大饱和结合度。这和在免疫组织化学试验中选择抗血清的最佳工作浓度的原则一样。最适宜的探针浓度应能获得最强的信号，同时背景染色低。最适宜的探针浓度要经预试验确定。通常放射性同位素探针的浓度为 0.5 ng/μL，非放射性探针浓度为 2 ng/μL。

（四）掌握杂交温度和时间。杂交温度应低于杂交体的融解温度 20℃ ~ 30℃。如所形成的杂交体的温度为 70℃，那么杂交温度应在 40℃ ~ 50℃左右。因为在这一温度条件下进行杂交，杂交率最高。能使 50%的核苷酸变性解链的温度叫解链温度或融解温度（melting temperature, Tm）。原位杂交中，多数 DNA 探针需要的 Tm 是 90℃，而 RNA 需要 95℃，这种高温是不可能保存组织形态完整和保持组织切片黏附于载玻片上的。因此，杂交液中需要常规加入 30% ~ 50%甲酰胺。McConaughy 报告，反应液中每增加 1%甲酰胺浓度，Tm 可降低 0.72℃，当杂交液含 50%甲酰胺，盐浓度为 0.75 mol/L 左右时，DNA 探针的温度约为 42℃，RNA 探针为 50℃ ~ 55℃，寡核苷酸探针约为 37℃。杂交反应的时间与核酸探针长度及组织通透性有关，需经反复实验而确定。通常可将杂交液和标本孵育过夜，但杂交反应时间不要超过 24 h。反应时间过长，形成的杂交体会解链，杂交信号反而会减弱。非放射性原位杂交探针浓度一般较高（2 μg/mL），杂交反应的时间也较短，甚至 30 min 即可得到充分反应。

三、杂交后处理（post hybridization treatment）

杂交后处理包括系列不同浓度、不同温度的盐溶液的漂洗。洗涤盐溶液的浓度、温度、洗涤次数和时间因核酸探针的类型和标记物种类的不同而略有差异，通常盐溶液的浓度是由高到低，温度则由低到高。漂洗过程中切勿使切片干燥。杂交后漂洗的目的是除去未参与杂交体形成的过剩探针，除去探针与组织标本之间的非特异性结合，减低背景染色，达到理想的信/噪比。

四、显示（visualization）

显示是根据核酸探针标记物的种类，分别利用酶检测系统进行显色处理或进行放射自显影显色处理，显色的方法因探针的标记物不同而异，显色后，细胞或组织的原位杂交切片均可进行半定量的测定。非放射性核酸探针杂交的细胞或组织可利用酶检测系统显色，然后利用显微分光光度计或图像分析仪对不同类型和数量的核酸的显色强度进行检测。放射自显影可利用图像分析检测仪（ computer - arristed image analysis）检测银粒的数量和分布。但对原位杂交进行半定量测定时必须注意严格控制实验的同一条件，如切片的厚度和核酸的保存量等。

五、原位杂交的对照试验

原位杂交的对照试验包括组织对照、探针对照、杂交反应对照和检测系统对照在内的一系列阳性和阴性对照。对照试验的设置须根据核酸探针和靶核苷酸的种类和现有的可能条件去选择。例如不加探针的空白对照和预先将切片用 DNA 酶或 RNA 酶消化，然后用 ISHH 技术证明丢失的 DNA 或 RNA。如同免疫组化的吸收试验一样，事先与特异性的 cD-

NA或cRNA进行杂交，再进行ISHH，其结果应为阴性。由于影响ISHH实验结果的因素太多，故对ISHH结果的解释应持慎重态度。

六、原位杂交组织化学与免疫组织化学结合法

原位杂交组织化学（ISHH）与免疫组织化学（IHC）可以结合进行。结合的方式有在相邻的切片上分别进行ISHH和IHC染色，也可先后在同一切片上进行ISHH和IHC染色。前者可使ISHH和IHC染色都获得理想的结果，易成功，但易产生空间误差和样本误差。后者是ISHH与IHC相结合的双标记技术，可避免相邻切片法观察时的不便，在相邻切片上用ISHH和IHC技术进行同一细胞内基因及其产物的定位，必须制备高质量的连续切片，使对比观察和结果分析更为确切。

在ISHH与IHC双标记技术中，固定剂的选择十分重要，选用的固定剂除了能保持组织细胞良好形态结构外，还要同时有利于抗原和靶核酸的保留，使之同时获得满意的免疫组织化学阳性反应和原位杂交信号。2%～4%多聚甲醛是mRNA原位杂交的常用固定剂，如果在此固定条件下被测抗原也能保持稳定，则可用于双标记技术。双标记技术实际是在同一切片上先后两次染色，但第一次染色总要或多或少地影响第二次染色，使第二次染色不十分理想。实践中往往首先进行原位杂交染色，而后再进行免疫组织化学的染色，这种次序使结合法易成功。

（金　岩）

参考文献

1. 郑一守、杨秀珍编著．免疫细胞化学及其在生物学和医学上的应用．第1版．南京：南京大学出版社．1990
2. 刘彦仿主编．免疫组织化学．第1版．北京：人民卫生出版社．1990
3. 吴海珍、文玲英．低温脱钙冰冻切片法在牙髓免疫组化中的应用．上海口腔医学．1993;2(1):38
4. 吴海珍、文玲英、王泊云．牙髓中HLA－Ⅱ类抗原的免疫电镜研究．牙体牙髓牙周病学杂志．1993;3(3):160
5. 吴海珍、文玲英、王泊云．用免疫组化法对正常和炎症牙髓中免疫细胞的研究．牙体牙髓牙周病杂志．1993;3(3):154－157
6. 蔡文琴、王泊云主编．实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术．第1版．成都：四川科学技术出版社．1994
7. 苏慧慈．原位杂交．第1版．北京：中国科学技术出版社．1994

附录一

牙髓微生物学相关细菌菌名索引

种属名	译 名
Acidaminococcus	氨基酸球菌属
Actinobacillus	放线杆菌属
A. actinomycetemcomitans	伴放线放线杆菌
A. capsulatus	荚膜放线杆菌
A. delphinicola	居海豚放线杆菌
A. equuli	马驹放线杆菌
A. hominis	人放线杆菌
A. indolicus	吲哚放线杆菌
A. lignieresii	李氏放线杆菌
A. minor	微小放线杆菌
A. muris	鼠放线杆菌
A. pleuropneuminiae	胸膜肺炎放线杆菌
A. porcinus	居猪放线杆菌
A. rossii	罗氏放线杆菌
A. scotiae	苏格兰放线杆菌
A. seminis	精液放线杆菌
A. succinogenes	产琥珀酸放线杆菌
A. suis	猪放线杆菌
Actinomyces	放线菌属
A. bernardiae	伯纳德放线菌
A. bovis	牛放线菌
A. denticliens	齿垢放线菌
A. europaeus	欧洲放线菌
A. georgiae	乔治放线菌
A. gerencseriae	格拉斯放线菌
A. hordeovulneris	受损大麦放线菌
A. howellii	豪威放线菌
A. hyovaginalis	猪阴道放线菌
A. israelii	衣氏放线菌
A. meyeri	梅氏放线菌
A. naeslundii	内氏放线菌
A. neuii	诺伊放线菌
A. odontolyticus	溶齿放线菌
A. pyogenes	化脓放线菌

A. radingae	雷底放线菌
A. slackii	斯莱克放线菌
A. viscosus	黏性放线菌
Bacteroides	类杆菌属
B. caccae	粪类杆菌
B. capillosus	多毛类杆菌
B. distasonis	吉氏类杆菌
B. eggerthii	埃氏类杆菌
B. fragilis	脆弱类杆菌
B. merdae	屎类杆菌
B. ovatus	卵形类杆菌
B. putredinis	腐败类杆菌
B. splanchnicus	内脏类杆菌
B. stercoris	便类杆菌
B. thetaiotaomicron	多形类杆菌
B. uniformis	单形类杆菌
B. ureolyticus	解脲类杆菌
B. vulgatus	普通类杆菌
Bifidobacterium	双歧杆菌属
B. adolescentis	青春双歧杆菌
B. angulatum	角双歧杆菌
B. bifidum	两叉双歧杆菌
B. breve	短双歧杆菌
B. catinulatum	小链双歧杆菌
B. coryneforme	棒状双歧杆菌
B. denticolens	居齿双歧杆菌
B. dentium	齿双歧杆菌
B. globosum	球形双歧杆菌
B. infantis	婴儿双歧杆菌
B. inopinatum	异态双歧杆菌
B. longum	长双歧杆菌
B. merycicum	瘤胃双歧杆菌
B. minimum	最小双歧杆菌
B. pseudocatenulatum	假小链双歧杆菌
B. pseudolongum	假长双歧杆菌
B. ruminantium	反刍双歧杆菌
B. saeculare	世纪双歧杆菌
Capnocytophaga	二氧化碳噬纤维菌属
C. gingivalis	牙龈二氧化碳噬纤维菌

C. ochracea	黄褐二氧化碳噬纤维菌
C. sputigena	生痰二氧化碳噬纤维菌
C. haemolytica	溶血二氧化碳噬纤维菌
C. granulose	颗粒二氧化碳噬纤维菌
Catonella	卡顿菌属
C. morbid	病害卡顿菌
Eubacterium	优杆菌属
E. acidaminophilum	嗜氨基酸优杆菌
E. aerofaciens	产气优杆菌
E. alactolyticum	不解乳优杆菌
E. barkeri	巴克优杆菌
E. biforme	两形优杆菌
E. brachy	短优杆菌
E. cellulosolvens	溶纤维优杆菌
E. combesii	柯氏优杆菌
E. contortum	扭曲优杆菌
E. coprostanoligenes	产粪醇优杆菌
E. formicigenerans	产甲酸优杆菌
E. hadrum	庞大优杆菌
E. hallii	霍氏优杆菌
E. lentum	迟缓优杆菌
E. limosum	黏性优杆菌
E. minutum	小优杆菌
E. moniliforme	念珠状优杆菌
E. multiforme	多形优杆菌
E. nitritogenes	产亚硝酸优杆菌
E. nodatum	缠结优杆菌
E. ramulus	细枝优杆菌
E. ractale	直肠优杆菌
E. saburreum	沙优杆菌
E. saphenum	隐蔽优杆菌
E. siraeum	惰性优杆菌
E. tenue	纤细优杆菌
E. timidum	胆怯优杆菌
E. tortuosum	多曲优杆菌
E. uniforme	单形优杆菌
E. ventriosum	大腹优杆菌
E. yurii	遇尔优杆菌
Fusobacterium	梭杆菌属

PDG

F. prausnitzii	普拉梭杆菌
F. aliocis	龈沟梭杆菌
F. gonidiaformans	分生子梭杆菌
F. mortiferum	死亡梭杆菌
F. naiviforme	舟形梭杆菌
F. necrogenes	坏疽梭杆菌
F. necrophorum	坏死梭杆菌
F. necrophorum subsp	
Funduliforme	坏死梭杆菌成膜亚种
Necrophorum	坏死梭杆菌坏死亚种
F. nucleatum	具核梭杆菌
F. nucleatum subsp	
Fusiforme	坏死梭杆菌梭形亚种
Nucleatum	坏死梭杆菌具核亚种
Polymorphum	坏死梭杆菌多形亚种
Vincentii	坏死梭杆菌文森亚种
F. periodonticum	牙周梭杆菌
F. russii	拉氏梭杆菌
F. sulci	龈隙梭杆菌
F. ulcerans	溃疡梭杆菌
F. varium	变异梭杆菌
Hallella	霍尔菌属
H. seregens	血清霍尔菌
Helicobacter	螺杆菌属
H. pylori	幽门螺杆菌
H. mustelae	雪貂螺杆菌
H. cinadi	同性恋螺杆菌
H. fennelliae	芬奈尔螺杆菌
H. felis	猫螺杆菌
H. nemestrinae	猕猴螺杆菌
H. muridarum	鼠螺杆菌
H. acinonyx	猎豹螺杆菌
H. canis	犬螺杆菌
H. hepaticus	肝螺杆菌
H. pametensis	巴梅河螺杆菌
Lactobacillus	乳杆菌属
L. acidophilus	嗜酸乳杆菌
L. amylophilus	嗜淀粉乳杆菌
L. amylovorus	解淀粉乳杆菌

L. brevis	短乳杆菌
L. buchneri	布氏乳杆菌
L. casei	干酪乳杆菌
Subsp. casei	干酪亚种
Subsp. pseudoplantarum	假植物亚种
Subsp. rhamnosus	鼠李糖亚种
Subsp. tolerans	耐受亚种
L. crispatus	卷曲乳杆菌
L. delbrueckii	德氏乳杆菌
L. fermentum	发酵乳杆菌
L. gasseri	格氏乳杆菌
L. kefirgranum	酸奶乳杆菌
L. minutus	小乳杆菌
L. oris	口乳杆菌
L. paracasei	类干酪乳杆菌
L. plantarum	植物乳杆菌
L. rhamnosus	鼠李糖乳杆菌
L. reuteri	路特乳杆菌
L. rimae	龈隙乳杆菌
L. salivarius	唾液乳杆菌
L. uli	龈乳杆菌
Oribaculum	口杆菌属
O. catoniae	卡特口杆菌
Peptostreptococcus	消化链球菌属
P. anaerobius	厌氧消化链球菌
P. asaccharolyticus	不解糖消化链球菌
P. heliotrinreducens	还原天芥菜碱消化链球菌
P. indolicus	产吲哚消化链球菌
P. magnus	大消化链球菌
P. micros	微小消化链球菌
P. prevofii	普氏消化链球菌
P. productus	产生消化链球菌
P. tetradius	四联消化链球菌
Porphyromonas	卟啉菌属
P. asaccharolytica	不解糖卟啉菌
P. cangingivae	犬龈卟啉菌
P. canoris	犬口卟啉菌
P. canisulci	犬口沟卟啉菌
P. catoniae	卡顿卟啉菌

P. circumdentaria	齿周卟啉菌
P. crevioricanis	犬龈隙卟啉菌
P. endodontalis	牙髓卟啉菌
P. gingivalis	牙龈卟啉菌
P. gingivicanis	龈沟隙卟啉菌
P. macacae	恒河猴卟啉菌
P. salivosa	唾液卟啉菌
P. levii	莱氏卟啉菌
Prevotella	普氏菌属
P. bivia	两路普氏菌
P. buccae	颊普氏菌
P. buccalis	口颊普氏菌
P. corporis	躯体普氏菌
P. denticola	住齿普氏菌
P. disiens	解糖胨普氏菌
P. enoeca	栖居普氏菌
P. heparinolytica	解肝素普氏菌
P. intermedia	中间普氏菌
P. loescheii	罗氏普氏菌
P. melaninogenica	产黑色素普氏菌
P. nigrescens	变黑普氏菌
P. oralis	口腔普氏菌
P. oris	口普氏菌
P. oulora	齿龈普氏菌
P. ruminicola	栖留胃普氏菌
P. tannerae	坦纳普氏菌
P. veroralis	真口腔普氏菌
P. zoogleoformans	成胶团普氏菌
Propionibacterium	丙酸杆菌属
P. acidipropionici	丙酸丙酸杆菌
P. acnes	痤疮丙酸杆菌
P. avidum	贪婪丙酸杆菌
P. freudenreichii	费氏丙酸杆菌
P. granulosum	颗粒丙酸杆菌
P. jensenii	詹氏丙酸杆菌
P. lymphophilum	嗜淋巴丙酸杆菌
P. thoenii	特氏丙酸杆菌
Staphylococcus	葡萄球菌属
S. aureus	金黄葡萄球色菌

S. auricularis	耳葡萄球菌
S. capitis	头状葡萄球菌
S. caseolyticus	溶酪葡萄球菌
S. chromogenes	产色葡萄球菌
S. cohnii	孔氏葡萄球菌
S. epidermidis	表皮葡萄球菌
S. haemolyticus	溶血性葡萄球菌
S. hominis	人葡萄球菌
S. intermidius	中间葡萄球菌
S. lentus	缓慢葡萄球菌
S. muscae	黏膜葡萄球菌
S. kloosii	克氏葡萄球菌
S. pasteuri	巴氏葡萄球菌
S. pulvereri	普尔葡萄球菌
S. saccharolyticus	解糖葡萄球菌
S. simulans	模仿葡萄球菌
S. xylosus	木糖葡萄球菌
S. warneri	沃氏葡萄球菌
Stomatococcus	口腔球菌属
Streptococcus	链球菌属
S. acidominimus	稀酸链球菌
S. alactolyticus	非解乳糖链球菌
S. agalactiae	无乳链球菌
S. anginosus	咽颊炎链球菌
S. bovis	牛链球菌
S. canis	犬链球菌
S. constellatus	星座链球菌
S. cricetus	仓鼠链球菌
S. cristatus	嵴饰链球菌
S. downeii	唐耐链球菌
S. dysgalactiae	异乳链球菌
S. equi	马链球菌
S. equines	马肠链球菌
S. ferus	野生鼠链球菌
S. gordonii	格氏链球菌
S. hyointestinalis	猪肠链球菌
S. hyovaginalis	猪直肠链球菌
S. infantis	婴儿链球菌
S. iniae	海豚链球菌

S. intermedius	中间型链球菌
S. macacae	猕猴链球菌
S. mitis	轻型链球菌
S. mutans	变形链球菌
S. oralis	口腔链球菌
S. parasanguinis	副血链球菌
S. parauberis	副乳房链球菌
S. peroris	适口腔链球菌
S. pleomorphus	多形链球菌
S. pneumoniae	肺炎链球菌
S. porcinus	猪链球菌
S. pyogenes	化脓链球菌
S. ratti	鼠链球菌
S. salivarius	唾液链球菌
S. sanguinis	血链球菌
S. sobrinus	表兄链球菌(茸毛链球菌)
S. suis	豕链球菌
S. thermophilus	嗜热链球菌
S. thoraltensis	胸廓紧张链球菌
S. uberis	乳房链球菌
S. vestibularis	前庭链球菌
Veillonella	韦荣球菌属
V. atypical	非典型韦荣球菌
V. caviae	豚鼠韦荣球菌
V. dispar	殊异韦荣球菌
V. driceti	仓鼠韦荣球菌
V. parvula	小韦荣球菌
V. ratti	鼠韦荣球菌
V. rodentium	啮齿韦荣球菌

附录二

常见菌群的鉴别

1 葡萄球菌属

表 1　常见葡萄球菌的鉴别表

特性	金黄色葡萄球菌	表皮葡萄球菌	头状葡萄球菌	耳葡萄球菌	溶血性葡萄球菌	人葡萄球菌	解糖葡萄球菌	腐生葡萄球菌	沃氏葡萄球菌
菌落色素	+	-	-	-	V	-	-	V	V
需氧生长	+	+	+	+	+	+	-/W	+	+
在 15℃生长	+	-/W	-	-	-/W	-/W	-/W	+	V
在 45℃生长	+	+	+	+	+	+	+	V	+
在 10% NaCl 生长	+	W	+	+	+	W	ND	+	+
溶血反应	+	-/W	-/W	-	(+)	-/W	-	-	V
3-羟基丁酮	+	+	V	V	V	V	ND	+	+
还原硝酸盐	+	+/W	V	V	V	V	+	-	-/W
发酵:蔗糖	+	+	(+)	V	+	(+)	-	+	+
麦芽糖	+	+	-	(+)	+	+	-	+	(+)
蕈糖	+	-	ND	ND	+	ND	ND	+	ND
甘露醇	+	-	+	-	V	-	-	V	V
甘露糖	+	(+)	+	-	-	-	(+)	-	-
松二糖	+	V	-	V	V	+	ND	+	V
木糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-
纤维二糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-
凝集因子	+	-	-	-	-	-	-	-	-
凝固酶	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-
氧化酶	-	-	-	-	-	-	-	-	-
脲酶	+/W	+	+	-	-	+	ND	+	+
碱性磷酸酶	+	+	+	-	-	-	ND	-	-
耐热核酸酶	+	-	-	-	-	-	-	-	-
碱性核酸酶	+	+	ND	ND	-	ND	ND	-	ND
吡咯芳胺酶	-	-	ND	ND	+	ND	ND	-	ND
鸟氨酸脱羧酶	-	V	ND	ND	-	ND	ND	-	ND
β-半乳糖苷酶	V	+	ND	ND	-	ND	ND	+	ND
抵抗新生霉素	-	-	-	-	-	-	-	+	-
抵抗多黏菌素	+	+	-	-	-	-	ND	-	-

注:+ ≥90%的菌株阳性(+)80%~89%的菌株阳性+/W 大部分阳性,小部分弱阳性。
- ≥90%的菌株阴性-/W 大部分阴性,小部分弱阴性
W 弱反应　　V 结果可变　　ND 未检测

表 2　其他一些葡萄球菌的一般鉴别

特征	溶酪葡萄球菌	产色葡萄球菌	孔氏葡萄球菌	中间葡萄球菌	缓慢葡萄球菌	克氏葡萄球菌	施氏葡萄球菌	模仿葡萄球菌	木糖葡萄球菌
大菌落	-	+	V	+	-	V	-	+	+
色素	V	+	-	-	V	V	-	-	V
凝固酶	-	-	-	+	-	-	-	-	-
凝集因子	-	-	-	V	-	-	+	-	-
氧化酶	+	-	-	-	+	-	-	-	-
耐热核酸酶	ND	-	-	+	-	-	+	-	-
脲酶	-	+	-	+	-	V	-	+	+
溶血素	-	-	V	V	-	V	+/W	V	-
D-酒石酸盐	V	+	+	+	+	+	V	V	+

续表

3-羟基丁酮	-	-	V	-	-	V	+	V	V
水解七叶苷	ND	-	-	-	+	V	-	-	V
还原硝酸盐	+	+	-	+	+	-	+	+	V
发酵:乳糖	+	+	-	V	V	V	-	+	V
甘露醇	-	V	V	V	+	+	-	+	+
甘露糖	-	+	V	+	+	-	+	V	+
松二糖	-	V	-	V	+/-	-	-	-	V
阿拉伯糖	-	-	-	-	V	V	-	-	V
木糖	-	-	-	-	+/-	V	-	-	+
纤维二糖	-	-	-	-	+	-	-	-	-
麦芽糖	+	V	V	+/-	V	V	-	+/-	+
棉子糖	ND	-	-	-	+	-	-	-	-
蔗糖	V	+	-	+	+	+/-	-	+	+
耐新生霉素	-	-	+	-	+	+	-	-	+
耐多黏菌素	-	+	-	-	-	-	-	-	-

2 韦荣球菌属

表 3　韦荣球菌属细菌的一般特性表

菌种	血清群	触酶	果糖	生长时需腐胺和尸胺	DNA G+C mol%
小韦荣球菌	人源株:Ⅳ或Ⅵ	-	-	-/+	37~40
非典型韦荣球菌	Ⅴ或Ⅵ	-	-	-	36~40
殊异韦荣球菌	Ⅶ	+	-	+	38~40
啮齿韦荣球菌	Ⅱ	-	-	-/+	42~43
鼠韦荣球菌	Ⅲ	+	-	-	41~43
仓鼠韦荣球菌	Ⅰ	+	+	+/-	38~40
豚鼠韦荣球菌	Ⅷ	-	-	+/-	37~39

-/+:不需要多见,需要少见;+/-:需要多见,不需要少见。

3 链球菌属

3.1 唾液链球菌群

表 4　唾液链球菌群生化性能鉴别表

检测	唾液链球菌(*S. salivarius*)	前庭链球菌(*S. vestibularis*)	嗜热链球菌(C)(*S. thermophilus*)
β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 (N-Acetyl-D-glucosamine)	-/+(a)	+/-	-
苦杏仁苷(Amygdalin)	-/+(a)	+/-	-
对苯二酚葡糖苷(Arbutin)	+	-/+	V
土木香粉(Inulin)	+/-	-	-
乳糖(Lactose)	+	+/-	+
密二糖(Melibiose)	-/+	-	V
密三糖(Raffinose)	+/-(a)	-	V
水杨苷(Salicin)	+	+	-
α阿拉伯糖酶(a-L-Arabinosidase)	+(a)	+	ND
α半乳糖苷酶(a-D-Galactosidase)	-/+	-	-

续表

α 葡萄糖苷酶(a - D - Glucosidase)	+ / - (b)	+ / -	-
β 葡萄糖苷酶(b - D - Glucosidase)	+ / - (b)	-	-
β 岩藻糖苷酶(b - D - Fucosidase)	+ / - (b)	-	ND
七叶苷(Esculin)	+	+ / -	-
尿素(Urea)	+ / -	+	-
3 - 羟基丁酮[Acetoin(VP)]	+ / -	+ / -	+
H_2O_2	-	+ / -	ND
碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase)	+ / -		-
细胞外多糖 (Extracellular polysaccharide)	+	-	-

+ :≥90%的菌株阳性;

+ / - :50% ~ 89%的菌株表现阳性;

- / + :11% ~ 49%的菌株表现阳性;

- :≤10%的菌株表现阳性;

V:结果可变;

ND:未检测。

(a):菌株之间有差异;

(b):有报告提示结果可变;

(c):嗜热链球菌(*S. thermophilus*)通常在 50℃可生长,65℃存活 30min。

3.2 变形链球菌群

表 5　变形链球菌群细菌的生化性能鉴别表

检测	变形链球菌 *S. mutans*	表兄链球菌 *S. sobrinus*	仓鼠链球菌 *S. cricetus*	鼠链球菌 *S. ratti*	猕猴链球菌 *S. macacae*	唐耐链球菌 *S. downeii*	野生鼠链球菌 *S. ferus*
β - N - 乙酰氨基葡萄糖苷酶 (N - Acetyl - D - glucosamine)	+	-	+	+	+	ND	+
苦杏仁苷(Amygdalin)	+ / - (a)	-	+	+	+	ND	+
对苯二酚葡糖苷(Arbutin	+ (b)	-	+	+	ND	ND	+
糊糖(Dextrin)	-	-	-	-	-	ND	+
糖原(Glycogen)	-	-	-	-	ND	-	+
土木香粉(Inulin)	+	+	+	+	-	+	+
乳糖(Lactose)	+	+ / -	+ / -	+ / -	ND	+	+
甘露醇(Mannitol)	+	+ / -	+	+	+	+	+
密二糖(Melibiose)	+ / - (b)	-	+	+	-	+	-
密三糖(Raffinose)	+	-	+	+	+	-	-
水杨苷(Salicin)	+	-	+	+	ND	+	+
山梨醇(Sorbitol)	+	- / +	+	+	+	-	+
淀粉(Starch)	-	-	-	-	-	-	+
海藻糖(Trehalose)	+	+	+ / -	+	+	+	+
α 半乳糖苷酶 (a - D - Galactosidase)	+ (b)	-	ND	ND	ND	ND	ND
β 葡萄糖苷酶 (b - D - Glucosidase)	+	-	ND	ND	ND	ND	ND
精氨酸(Arginine)	-	-	-	+	-	-	-
七叶苷(Esculin)	+	+ / -	+ / -	+	+	-	+
3 - 羟基丁酮[Acetoin(VP)]	+	+	+	+	+	+	+ / -
H_2O_2	-	+	-	-	-	-	-
耐细菌素 (Resistance to bacitracin)	+	+	-	+	-	-	-

+ :≥90%的菌株阳性;

+ / - :50% ~ 89%的菌株表现阳性;

- / + :11% ~ 49%的菌株表现阳性;

－：≤10%的菌株表现阳性；
ND：未检测。
(a)：菌株之间有差异；
(b)：不发酵密二糖的菌株发酵苦杏仁苷、密三糖的能力也较小，而且不产生α半乳糖苷酶和β葡萄糖苷酶。

3.3 咽颊炎链球菌群

表6　咽颊炎链球菌群生化性能鉴别表

检测	咽颊炎链球菌 (*S. anginosus*)	星座链球菌 (*S. constellatus*)	中间型链球菌 (*S. intermedius*)
β－N－乙酰氨基葡萄糖苷酶 (N－Acetyl－D－glucosamine)	－/＋	－/＋	＋
苦杏仁苷(Amygdalin)	＋	－/＋	＋/－
乳糖(Lactose)	＋	＋/－	＋
甘露醇(Mannitol)	－/＋(a)	－	－
密二糖(Melibiose)	－/＋	－	V
密三糖(Raffinose)	－/＋(a)	－	－
α半乳糖苷酶(a－D－Galactosidase)	－(b)	－	＋
α葡萄糖苷酶(a－D－Glucosidase)	－/＋	＋	＋
β葡萄糖苷酶(b－D－Glucosidase)	＋	－	－/＋
β岩藻糖苷酶(b－D－Fucosidase)	－	－	＋
β－N－乙酰氨基葡萄糖苷酶 (b－D－N－Acetylglucosaminidase)	－	－	＋
β－N－乙酰氨基半乳糖苷酶 (b－D－N－Acetylgalactosaminidase)	－	－	＋
唾液酸酶(Sialidase)	－	－	＋
七叶苷(Esculin)	＋	＋(c)	＋
H_2O_2	－/＋	－	－
透明质酸酶(Hyaluronidase)	－	＋/－	＋

＋：≥90%的菌株阳性；
＋/－：50%～89%的菌株表现阳性；
－/＋：11%～49%的菌株表现阳性；
－：≤10%的菌株表现阳性；
V：结果可变；
ND：未检测。
(a)：分离自泌尿生殖道的咽颊炎链球菌(*S. anginosus*)通常表现阳性；
(b)：Ahmet et al (1995)报告该菌株如培养在高碳酸条件下，>50%的菌株可表现阳性；
(c)：有些菌株的反应较慢或较弱。

3.4 轻型链球菌群

表 7 轻型链球菌群细菌生化性能鉴别表

检测	*S. san*	*S. gor*	*S. mit*	*S. oral*	*S. par*	*S. cri*	*S. pneu*	*S. per*	*S. inf*
苦杏仁苷	-/+	+	-	-	-/+	-	-	-	-
对苯二酚葡糖苷	+/-	+	-	-	-/+	+	-	-	-
土木香粉	-/+	+	-/+	-	-	-	-	-	-(e)
乳糖	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+	+
密二糖	+/-	-/+	+/-	+/-(a)	+/-	-	-	-	-
密三糖	+/-	-/+	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-
水杨苷	+	+	-/+	-	+/-	ND	+/-	ND	ND
山梨醇	-/+	-	-/+	-	-/+	-	-	-	-
海藻糖	+	+	-/+	-/+	+/-	+	+	-	-
α半乳糖苷酶(c)	+/-	-/+	+/-	-/+	+	-	+	-	-
β半乳糖苷酶(c)	-/+(b)	-/+(b)	-/+(b)	+/-	+	-/+	+	-	+
α葡萄糖苷酶(c)	-	-/+(b)	+/-(b)	+	+	-	+	ND	ND
β葡萄糖苷酶(c)	+/-	+	+/-(b)	-	-/+	-	-/+	-	-
α岩藻糖苷酶	-	+	-	-	-/+	+	-/+	ND	ND
β岩藻糖苷酶	+/-(b)	-	+/-(b)	-(b)	-/+	-	-/+	-	+/-
β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶	-	+/-	-	+	ND	+	+	-	+
β-N-乙酰氨基半乳糖苷酶	-/+(b)	+	-(b)	+	+	+	+/-	ND	ND
唾液酸酶	-	-	-/+	+	-	-	+	ND	ND
精氨酸	+	+	-(b)	-	+	+/-	-	-	-
七叶苷	+/-	+	-	-/+	-/+	-	-/+	ND	ND
碱性磷酸酶	-	+	+/-	+	+	-	-	-/+	-
结合淀粉酶	-	+	+	-	+	+	+	ND	ND
细胞外多糖	+	+	-	+/-	-	V(d)	-	ND	ND
透明质酸酶	-	-	-	-	-	-	+	ND	ND
Ig A 蛋白酶	+	-	-/+	+	ND	ND	+	ND	ND

S. san:血链球菌;*S. gor*:格氏链球菌;*S. mit*:轻型链球菌;*S. oral*:口腔链球菌;

S. par:副血链球菌;*S. cri*:嵴饰链球菌;*S. pneu*:肺炎链球菌;*S. per*:适口腔链球菌;

S. inf:婴儿链球菌;

+:≥90%的菌株阳性;

+/-:50%~89%的菌株表现阳性;

-/+:11%~49%的菌株表现阳性;

-:≤10%的菌株表现阳性;

ND:未检测。

(a):大多数菌株的发酵反应比其他碳水化合物弱;

(b):不同的报告菌株检测结果的阳性率有差异;

(c):以提取的实验方法的不同而结果有所不同;

(d):报告结果有差异。

4 放线杆菌属

表 8 一些放线杆菌的菌种鉴别

菌种	产酸											β溶羊血	生长于芽琼脂	鸟氨酸脱羧酶	β-半乳糖苷酶	氧化酶	触酶	脲酶
	肌醇	乳糖	蔗糖	木糖	半乳糖	麦芽糖	甘露醇	甘露糖	密二糖	棉子糖	山梨醇							
伴放线放线杆菌	-	-	-	V	+	+	(+)	+	-	-	(-)	-	V	-	-	+	+	-
杆菌	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
居海豚放线杆菌	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	V	-	+	-	-
马驹放线杆菌	-	+	+	+	V	+	+	+	+	+	V	-	+	-	V	(+)	V	+
人放线杆菌	-	+	+	+	+	+	+	-	+/L	+	-	-	-	-	+	+	-	+
吲哚放线杆菌	-	(-)	+	(-)	+	+	-	+	(-)	ND	-	-	-	-	+	(-)	+	-
李氏放线杆菌	-	V/L	+	+	+	+	+	+	-	V	(-)	-	+	-	V	(+)	V	+
微小放线杆菌	-	+	+	(-)	(+)	+	-	+	(-)	ND	-	-	-	-	+	(-)	-	+
鼠放线杆菌	V/W	-	+	-	V/W	+	+	+	+/L	+	(-)	-	-	-	-	+	+	+
胸膜肺炎放线杆菌	-	V	+	+	+/W	+	+	+	-	V	-	+	-	-	+	V	V	+
居猪放线杆菌	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	(-)	+	(-)	ND	(-)	-	-	-	+	(-)	-	-
罗氏放线杆菌	+	V	-	+	+	(-)	+	V	-	(-)	+	V	(+)	-	(+)	+	+	+
苏格兰放线杆菌	-	+	-	-	(-)	-	-	+	-	ND	-	-	-	(-)	+	+	-	-
精液放线杆菌	V	-	-	-	V/L	V/L	V/L	-	-	-	-	-	-	V	-	V	+	-
猪放线杆菌	-	+	+	+	(+)	+	-	+	+	+	-	(+)	+	-	(+)	(+)	+	+

+:90%～100%阳性；-:90%～100%阴性；W:弱反应；L:迟反应；V:21%～79%阳性；(+):80%～89%阳性；(-):11%～20%阳性。

5 放线菌属

表 9 一些常见放线菌种的鉴别

菌种	β溶血	还原硝酸盐	还原七叶苷	脲酶	水解明胶	触酶	糖发酵					DNA G+C mol/%(TM)
							葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	甘露醇	木糖	
牛放线菌	V	-	V	-	-	-	+	V	+	-	-	57－63
齿垢放线菌	+	V	-	-	+	+	+	+	-	V	65－67	
乔治放线菌	-	V	V	-	-	-	+	++	V	+		
格拉斯放线菌	-	V	+	-	-	-	+	+	+	V	V	
猪阴道放线菌	-	+	+	-	-	-	+	+	+	ND	+	
衣氏放线菌	-	V	+	-	-	-	+	+	+	V	+	57－65
梅氏放线菌	-	-	-	V	-	-	+	V	+	-	+	64－67
内氏放线菌	-	V	+	+	ND	-	+	+	+	V	V	63－68
溶齿放线菌	-	+	V	-	-	-	+	V	+	-	V	62
化脓放线菌	+	-	-	-	+	-	+	V	V	V	+	56－58
伯纳德放线菌	V	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
黏性放线菌	-	V	V	V	-	+	+	V	-	-	-	59－69

6 梭杆菌

表 10　常见梭杆菌的鉴别

菌种	菌体形态	20%胆汁中生长	脂酶	七叶苷水解	明胶液化	靛基质实验	PYG 培养基中		糖发酵			G+C mol %
							产气	脂肪酸	脂肪酸	葡萄糖	乳糖	
分生子梭杆菌	短小，多形型	-	-	-	-	+	4/2	A，B，p	-	-	-	N
死亡梭杆菌	异常，圆形体	+	-	-	-	-	4	a，B，p	+/W	+	+/W	26-28
舟形梭杆菌	舟形	-/+	-	-	-	+	-/2	a，B，L	W/-	-	-	N
坏死梭杆菌	大，多形	-	+/-	+	+	+	4/2	a，B，p	-/W	-	-/W	31-34
具核梭杆菌	纤细，二端尖	-	-	-	-	+	-/2	a，B，p	-/W	-	-/W	27-28
拉氏梭杆菌	二端尖，有丝状体	-	-	-	-	-	2/-	a，B，L	-	-	-	31
变异梭杆菌	球、杆或多形	+	-	-	-	+/-	4	a，B，P	+/W	-	W/+	26-29
溃疡梭杆菌	二端尖，中央膨大	+	-	-	-	+	4	a，B，P	-	-	-	N
龈沟梭杆菌	二端尖圆，成对排列	-	-	-	-	-	2	a，b	-	-	-	34
龈缘梭杆菌	二端圆，短链状排列	-	-	-	-	-	-/2	a，B	-	-	-	39
牙周梭杆菌	二端尖圆，丝状体长	-	-	-	-	-	-/2	a，B	-	+	-	28

+：阳性；-：阴性（或无气体）；+/-：大部分阳性；-/+ 大部分阴性；+/W：大部分阳性，小部分弱阳性；-/W：大部分阴性，小部分弱阳性；W/- 大部分弱阳性，小部分阴性；2：产生气体致琼脂水平破裂；4：产生气体致琼脂顶或管上部；A、B、P、L：分别为乙酸、丁酸、丙酸、乳酸，大写表示产生大量，小写表示产生少量；N：未做检测。

7 普氏菌属

表 11　普氏菌属的主要鉴别特征

菌名	两路普氏菌	颊普氏菌	口颊普氏菌	躯体普体菌	牙普氏菌	住齿普氏菌	解糖胨普氏菌	栖居普氏菌	解胨索普氏菌	中间普氏菌	罗氏普氏菌	产黑色素普氏菌	变黑普氏菌	口腔普氏菌	口普氏菌	齿龈普氏菌	栖留胃普氏菌	坦纳普氏菌	真口腔普氏菌	成胶闭普氏菌
血平板上产生色素	-	-	-	+	-	V	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	V	-	-
木糖	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	N	+	-	-	V	-	V	V
阿拉伯糖	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	N	-	+	-	+	-	-	V
纤维二糖	-	+	+	-	+	V	-	-	+	-	+	V	N	+	+	-	+	-	V	V
鼠李糖	-	+/-	-	-	-	-	N	-	-	-	N	+	-/+	-	+	-	-			
甘露糖	+	+	+	+	+	+	-	V	+	V	+	+	N	+	+	+	+	V	+	V
棉子糖	-	+	+	-	+	+	-	-	-	V	+	+	N	+	+	+	+	V	+	V
明胶	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	N	+	V	-	+	+	-	-
蔗糖	-	+	+	-	N	+	-	N	+	+	+	+	N	+	+	-	+	N	+	+
乳糖	+	+	+	-	N	+	-	N	+	-	+	+	N	+	+	+	+/W	N	+	+
水杨苷	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-/V	-	N	+	+	-	+/W	-	-/V	V
吲哚	-	-	-	-	N	-	-	-	+	+	-/+	-	N	-	-	-	-	N	-	-/+
七叶苷水解酶	-	+	+	-	N	+	-	+	+	-	+/-	-	N	+	+	-	+	N	+	+
N-乙酰葡糖胺酶	+	+	-	+	N	+	-	+	N	-	+	+	N	+	+	+	+	N	+	+
α-岩藻糖苷酶	+	+	-	-	N	+	-	+	N	+/-	+	+/-	N	+	+	+	+	N	+	N
β-木糖苷酶	-	+	-	N	N	N	N	N	+	N	N	N	N	-	+	-	N	N	N	N
β-葡萄糖苷酶	-	+	+	-	N	-	-	+	+	-	+/-	-	N	+	+	+	N	+	+	N
甘氨酸氨基糖苷酶	+	-	-	-	N	-	+	-	+	-	-	-	N	-	-	-	-	N	-	-

+：阳性反应；-：阴性反应；+/W：弱阳性；+/-：少数反应阴性；-/+：少数反应阳性；-/V：大部分阴性，少数可变；N：未检测。

8 类杆菌属

表 12　类杆菌常见生化特征鉴别表

菌种	*B. ca*	*B. di*	*B. eg*	*B. fr*	*B. me*	*B. ov*	*B. st*	*B. th*	*B. un*	*B. vu*	*B. cap*	*B. pu*	*B. sp*	*B. ur*
20%胆汁生长	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+ +	–
靛基质实验	–	–	+	–	–	+	+	+	+	–	–	+	+	–
触酶	–/+	+/–	–	+	–/+	+/–	–	+	–/+	–/+	–	–/+	–	–
七叶苷水解	+	+	+	+	+	+	+/–	+	+	–/+	+	–	+	–
糖发酵														
阿拉伯糖	+	–/+	+	–	–/+	+	–/+	+	+	+	–	–	+	–
纤维二糖	+/–	+	–/+	+/–	V	+	–/+	+/–	+	–	–	–	– –	
鼠李糖	+	V	+/–	–	+	+	+	+	–/+	+	–	–	–	–
水杨素	–/+	+	–	–	+	+	–/+	–/+	+/–	–	–	–	–	N
蔗糖	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–
木聚糖	–	–	+	–	–	+	V	–	V	–/+	–	–	–/+	N
α岩藻糖苷酶	+	–	–	+	–	+	V	+	+	+	N	–	N	N
G + C mol%值	N	43 – 45	44 – 46	41 – 44	N	39 – 43	N	40 – 43	45 – 48	40 – 42	60	N	N	28 – 30

+：阳性；–：阴性；+/–：大部分阳性，小部分阴性；–/+：大部分阴性，小部分阳性；V：菌株性能可变；N：未检测。表中的细菌缩写分别为：*B. ca*：粪类杆菌；*B. cap*：多毛类杆菌；*B. di*：吉氏类杆菌；*B. eg*：埃氏类杆菌；*B. fr*：脆弱类杆菌；*B. me*：尿类杆菌；*B. ov*：卵形类杆菌；*B. pu*：腐败类杆菌；*B. sp*：内脏类杆菌；*B. st*：便类杆菌；*B. th*：多形类杆菌；*B. un*：单形类杆菌；*B. ur*：解脲类杆菌；*B. vu*：普通类杆菌。

9 弯曲菌属

表 13　常见弯曲菌属细菌的常见生化特征鉴别表

菌种	*C. bu*	*C. co*	*C. cu*	*C. fe*	*C. hi*	*C. je*	*C. mu*	*C. re*	*C. sh*	*C. sp*	*C. up*
触媒产生	+	+	–	+	–	+	–	–	+	–	W
硝酸盐还原	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
亚硝酸盐还原	–	–	+	–	ND	–	+	+	ND	+	–
需要氢气	–	–	+	–	–	–	+	+	+	–	–
脲酶产生	–	–	–	–	ND	–	–	–	–	–	–
硫化氢	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–
靛基质实验	+	+	+	–	+	+	–	+	+	–	+
15℃生长	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
25℃生长	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
42℃生长	+	+	+	–	+	+	+	W	+	+	+
3.5% NaCl 生长	–	–	–	–	V	–	–	–	–	–	–
1% 甘氨酸生长	+	+	+	+	V	+	+	+	V	+	V
麦康克琼脂	+	+	ND	+	ND	+	+	ND	ND	+	–
萘啶酸	S	S	S	V	S	S	R	S	R	S	S
噻孢菌素	R	R	ND	R	S	R	S	ND	S	S	S

+：阳性；–：阴性；W：弱阳性；V：菌株间有差异；ND：未检测；S：敏感；R：耐受。

细菌的缩写分别为：

C. bu：巴策尔弯曲菌；*C. co*：结肠弯曲菌；*C . cu*：曲线弯曲菌；*C. fe*：胎儿弯曲菌；

C. hi：瑞士弯曲菌；*C. je*：空肠弯曲菌；*C. mu*：鼻黏膜弯曲菌；*C. re*：直线弯曲菌；

C. sh：西洼弯曲菌；*C. sp*：痰液弯曲菌；*C. up*：凸起弯曲菌。

10 双歧杆菌属

表 14　人源性双歧杆菌一般生化特征表

菌种	糖发酵实验					淀粉	触媒	硝酸盐	靛基质	吐温－80
	葡萄糖	乳糖	甘露醇	阿拉伯糖	水杨素	水解	实验	还原	实验	刺激生长
青春双歧杆菌	+	+	V	+	+	－	－	－	－	
角双歧杆菌	+	+	－	+	+	+	－	－	－	－
两叉双歧杆菌	+	+	－	－	－	－	－	－	－	－
短双歧杆菌	+	+	V	－	+	－	－	－	－	－
小链双歧杆菌	+	+	V	+	+	+	－	－	－	－
齿双歧杆菌	+	+	+	+	+	+	－	－	－	－
婴儿双歧杆菌	+	+	－	－	－	－	－	－	－	+
长双歧杆菌	+	+	－	+	－	－	－	－	－	+
假小链双歧杆菌	+	+	－	+	+	+	－	－	－	－

V：菌株之间有差异；在吐温－80 刺激生长中，+ 表示刺激生长，－ 表示无刺激生长作用。

11 优杆菌属

表 15　优杆菌属常见细菌的生化特征表

菌种	糖发酵实验						七叶灵水解	液化明胶	硝酸盐还原	吲哚实验
	葡萄糖	甘露醇	阿拉伯糖	蔗糖	水杨素	乳糖				
短优杆菌	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
不解乳优杆菌	+	－	－	－	－	－	－	－	－	－
沙优杆菌	+/W	－/+	－	+	－	V	+	－	－	+
胆怯优杆菌	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
缠结优杆菌	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
迟缓优杆菌	－	－	－	－	－	－	－	－	+	－
黏性优杆菌	+	－/W	－/+	－	－	－	+	V	－	－
产气优杆菌	+	+	－	+	+	+	+/－	－	－ －	
扭曲优杆菌	+	V	+	+	+	+/－	+	－	－	－
念珠状优杆菌	+	+	－	－	－	－	－	－/W	V	－
纤细优杆菌	W/－	－	－	－	－	－	－	+	－	+
大腹优杆菌	+/W	+	+	V	－	－/+	+	－	－	－
多曲优杆菌	+/W	－	－	+	W/－	－/+	+	－	V	－
柯氏优杆菌	－	－	－	－	－	－	－	+	－	－
产亚硝酸优杆菌	+	+	－	V	V	－	+	－/W	+	－

12 消化链球菌属

表 16　消化链球菌属细菌的一般生化特征表

菌种	厌氧消化链球菌	不解糖消化链球菌	还原天芥菜碱消化链球菌	产吲哚消化链球菌	微小消化链球菌	大消化链球菌	普氏消化链球菌	产生消化链球菌	四联消化链球菌
糖发酵产酸									
葡萄糖	W/ -	-	-	-	-	- /W	W	+	+
乳糖	-	-	-	-	-	-	-	-	+
蔗糖	- /W	-	-	-	-	-	- /W	+	+
麦芽糖	W/ -	-	-	-	-	-	W/ -	+	+
甘露醇	-	-	-	-	-	-	V	+	+
从延胡索酸									
产生琥珀酸	ND	-	+	-	-	-	-	ND	ND
从乳酸盐									
产生丙酸盐	-	-	-	+	-	-	-	-	-
产生丁酸盐	-	+	D	+	-	-	+	+	-
吲哚试验	-	+	-	+	-	-	-	-	-
硝酸盐还原	-	-	-	+	-	-	-	-	-
触媒活性	-	V	-	-	-	+ / -	V	V	-
水解七叶苷	-	-	-	-	-	-	- /W	- /W	+
凝固酶	-	-	ND	+	-	-	-	-	ND
脲酶活性	-	-	-	-	-	-	- / +	+	D
甘氨酸产氨	-	-	ND	-	W	+	-	-	ND
谷氨酸盐产氨	-	+	ND	+	-	-	-	-	ND
碱性磷酸酶	-	-	ND	+	+	- /D	+	-	ND
β - 葡萄糖苷酸酶	-	-	ND	-	-	-	-	+	ND
α - 葡萄糖苷酶	+	-	ND	-	-	-	-	W	ND
G + C mol%	33 - 34	31 - 32	35 - 37	32 - 34	27 - 28	32 - 34	29 - 33	30 - 32	44 - 45

- :阴性; + :阳性;D:不同菌株反应不同;W:弱阳性;V 反应可变,不恒定;ND:未检测。

13 奈瑟氏菌属

表 17　常见奈瑟氏菌的解糖和营养特征鉴别表

菌种	菌落形态(巧克力色琼脂)	糖发酵					MTM 选择性培养基	血琼脂生长(22℃)	营养琼脂(37℃)	硝酸盐还原
		葡萄糖	麦芽糖	乳糖	蔗糖	果糖				
淋病奈瑟氏菌	米色至灰棕,光滑半透明,0.5 ~ 1.0mm	+	-	-	-	-	+	-	-	-
脑膜炎奈瑟氏菌	米色至灰棕,光滑半透明,1 ~ 3mm	+	+	-	-	-	+	-	V	-
乳糖奈瑟氏菌	米色至灰棕,光滑半透明,1 ~ 2mm	+	+	+	-	-	+	V	+	-
灰色奈瑟氏菌	米色至灰棕或黄,光滑半透明,0.5 ~ 1.0mm	-	-	-	-	-	V	-	+	-
多糖奈瑟氏菌	米色至灰棕或黄,光滑半透明,0.5 ~ 1.0mm	+	+	-	-	-	V	-	+	-
微黄奈瑟氏菌	绿黄,浊,光滑到粗,有时黏着,1 ~ 3mm	+	+	-	V	V	V	+	+	-
干燥奈瑟氏菌	白,浊,干,黏着,皱纹状,1 ~ 3mm	+	+	-	+	+	-	+	+	-
黏液奈瑟氏菌	绿黄,光滑,1 ~ 3mm,浊	+	+	-	+	+	-	+	+	+
长奈瑟氏菌	灰棕,半透明,光滑,干,土样,1 ~ 2mm	-	-	-	-	-	-	+	+	-

14 奴卡菌属

表 18　一些重要奴卡菌属细菌的分类和生化特征鉴别表

菌种	星状奴卡菌	肉色奴卡菌	黄尾奴卡菌	超桔奴卡菌	短链奴卡菌	南非奴卡菌	巴西奴卡菌	类巴西奴卡菌
分解：	腺嘌呤	–	–	–	–	–	V	–
+	酪蛋白	–	–	–	–	–	–	+
+	次黄嘌呤	–	–	–	–	–	+	+
+	酪氨酸	–	–	–	–	–	–	+
–	黄嘌呤	–	–	–	–	–	V	–
产酸自：	核酸	–	–	–	–	–	+	–
–	L－阿拉伯糖	–	–	–	+	–	–	–
–	赤藓糖	–	–	–	–	–	+	–
+	D－半乳糖	V	+	–	+	–	+	+
+	葡萄糖	+	+	+	+	–	+	+
+	肌醇	–	V	–	V	–	V	+
+	甘露醇	–	+	–	–	–	V	+
–	L－鼠李糖	V	–	–	V	–	–	–
–	D－山梨醇	–	–	–	V	–	V	–
+	海藻糖	V	+	–	V	–	V	+
产生：	硝酸基还原酶	+	+	ND	+	–	+	+
+	脲酶	+	–	–	+	–	+	+

15 螺杆菌属

表 19　与口腔有一定关系的螺杆菌生化特征表

特征	幽门螺杆菌	同性恋螺杆菌	芬奈尔螺杆菌	鼠螺杆菌	巴梅河螺杆菌	犬螺杆菌	猕猴螺杆菌	猫螺杆菌
触酶	+	+	+	+	+	–	+	+
还原硝酸盐	–	+	–	–	+	–	–	+
碱性磷酸酶	V	–	+	+	+	+	+	+
脲酶	+	–	–	+	–	–	+	+
42℃生长	–	–	–	–	+	+	+	+
1%甘氨酸生长	–	+	+	–	+	ND	–	–
吲哚酚乙酰盐水解	–	–	+	+	–	+	–	–
鞭毛/细胞	4－8	1－2	2	10－14	2	2	4－8	14－20
鞭毛分布	双极	双极	双极	双极	双极	双极	双极	双极
G＋C mol%	35－37	37－38	35	34	38	48	24	42